

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



TESIS DOCTORAL

**Sensores metabólicos en el cerebro: intercomunicación con los péptidos
reguladores de la ingesta de alimentos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Verónica Hurtado Carneiro

Directores
Elvira Álvarez García
María del Carmen Sanz Miguel

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III



SENSORES METABÓLICOS EN EL CEREBRO.
INTERCOMUNICACIÓN CON LOS
PÉPTIDOS REGULADORES DE LA INGESTA DE ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

VERÓNICA HURTADO CARNEIRO

2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



SENSORES METABÓLICOS EN EL CEREBRO.
INTERCOMUNICACIÓN CON LOS
PÉPTIDOS REGULADORES DE LA INGESTA DE ALIMENTOS

VERÓNICA HURTADO CARNEIRO

MADRID, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**SENSORES METABÓLICOS EN EL CEREBRO.
INTERCOMUNICACIÓN CON LOS
PÉPTIDOS REGULADORES DE LA INGESTA DE ALIMENTOS**

MEMORIA PRESENTADA POR

VERÓNICA HURTADO CARNEIRO

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

BAJO LA DIRECCIÓN DE

LA DRA. ELVIRA ÁLVAREZ GARCÍA

LA DRA. MARÍA DEL CARMEN SANZ MIGUEL



Dña. **ELVIRA ÁLVAREZ GARCÍA**, profesora titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y

Dña. **MARÍA DEL CARMEN SANZ MIGUEL**, ayudante doctor del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la licenciada **Verónica Hurtado Carneiro** ha realizado el trabajo titulado: **“SENSORES METABÓLICOS EN EL CEREBRO. INTERCOMUNICACIÓN CON LOS PÉPTIDOS REGULADORES DE LA INGESTA DE ALIMENTOS”**, bajo nuestra dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid para optar al grado de Doctor.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Madrid, a 10 de Febrero de 2014.

VºBº de los Directores

Fdo.: María del Carmen Sanz Miguel

Fdo.: Elvira Álvarez García

Da tu primer paso ahora. No importa que no veas el camino completo. Sólo da tu primer paso y el resto del camino irá apareciendo a medida que camines...

Martin Luther King

La gratitud da sentido a nuestro pasado, trae paz al presente y crea una visión para el mañana...

Después de todo este tiempo, y ahora que me encuentro en la recta final, me surge la necesidad de manifestar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quería agradecer a mis directoras de tesis, la Dra. Elvira Álvarez y la Dra. Carmen Sanz, la oportunidad que me han brindado para la realización de este trabajo. Elvira, gracias por tu paciencia y comprensión durante todo este tiempo y por el gran esfuerzo y tiempo dedicado. Gracias por confiar en este proyecto y en mí para llevarlo a cabo. Carmen, gracias por estar siempre dispuesta a enseñármelo todo, por tu creatividad, por el cariño recibido y por alentarme y motivarme cuando ya lo daba todo por perdido.

También quería agradecer a todos los profesores y/o miembros del departamento que han contribuido de alguna forma a la realización de esta tesis. Al Dr. Enrique Blázquez el haberme acogido en su grupo de investigación e impulsar en todo lo que ha podido mi carrera investigadora. A la Dra. Isabel Roncero por su ayuda y buena disposición, por sus consejos, por su sinceridad y por defender siempre sus ideas. A los Dres. Esther Velázquez y Juan Miguel Ruiz por valorarme y tener en cuenta mis opiniones. A los Dres.: Ángeles Navas, Ángel Santos, José Antonio Zueco...por su amabilidad.

No me puedo olvidar de toda la gente con la que me he topado a lo largo de estos años y que siempre me han aportado algo bueno. A los que ya estaban cuando llegué: Pedro, María Galán, Javi...y a los que han ido pasando: Alberto, Cristiana Leite, Virginia, Lisa...muchas gracias. En especial a Marketa, gracias por el interés demostrado y por tus ganas de aprender.

Tengo que agradecer a María Ángeles, Cynthia e Inés esos momentos de relax, que son pocos, pero de calidad. Gracias por contar siempre conmigo.

A Cris y Helen, gracias por esos momentos inolvidables en el labo y fuera de él. Cris, dejas huella allí por donde pasas (aunque haya gente que te recuerde por otras cosas), porque te haces querer y eres genuina. A Helen, porque tienes un humor especial donde los haya, porque contigo es un orgullo ser una "SEÑORA".

A la gente del laboratorio "del fondo": Sandra, Elena, Ana, Núria por amenizar las comidas, por recibirme siempre con una sonrisa, por ayudarme con el HPLC...A Adrián, Ángel y Ana María por su disposición y buena compañía.

A Carmen García por haber compartido conmigo muchos momentos buenos y no tan buenos y por haberme ayudado en multitud de ocasiones.

Quiero agradecer a Patri, mi antecesora, todo lo que ha hecho por mí, por sus consejos, por compartir conmigo sus experiencias, por los momentos de congreso y porque nos has "salvado el cuello" tantas veces...ya no llevo la cuenta de cuantas cañas te debo.

Muchas gracias a Marta (Dra. Benito), una chiquilla tan divina y colosal...y posiblemente la única persona con la que podré "twistear" toda la vida. Gracias por transmitir como nadie felicidad y energía positiva a raudales, eres única. A Anita, mil gracias por todo, porque eres increíble, porque

siempre he podido contar contigo, por depositar tu confianza en mí. En definitiva, gracias a las dos por vuestra amistad, que la guardaré como un tesoro.

Tengo que agradecer con especial hincapié a “Antoñita Mari” todo lo que ha hecho por mí. Gracias por resolver mis dudas existenciales, por tus esquemas en papel (que guardo como oro en paño), por descubrirme la bohème, tosca...por esto te estaré eternamente agradecida, por tu espíritu aventurero, por los momentos que compartimos y sobre todo por el día a día. En definitiva, porque sacas lo mejor de mí.

Quiero agradecer a mis amigas de la Universidad de León: Monste, Pilar y Paula todos los momentos de apoyo y ánimo recibido.

A mis “supernenas”: Pi, gracias por tus palabras alentadoras y porque fue maravilloso conocerte y compartir contigo aquellos irrepetibles momentos en ANTIBIÓTICOS. Carmen, la persona más luchadora que conozco, gracias por todos los buenos consejos que me has dado, por todos esos ratos de desahogo, por valorarme y hacerme ver que todo es posible cuando lo intentas y no desistes. Por ser un modelo de coraje y superación.

Por supuesto, no puedo olvidarme de toda esa gente ajena al mundo de la investigación, pero imprescindibles en mi vida. Ellos se merecen una mención especial en mis agradecimientos.

A mi amiga Mari por estar siempre dispuesta a escucharme. Mari, gracias por tu amistad, por tu forma de ver la vida y por ese cariño que me das cuando más lo necesito, porque siempre te he tenido muy cerca, a pesar de estar tan lejos. A Moni, por todas esas vivencias que compartimos durante nuestra época estudiantil en León y que tanto nos marcaron.

Quiero agradecer a toda mi familia, en general, todo el apoyo y cariño recibido, y en particular:

A Sari, mi hermana, mi mejor amiga, mi confidente, mi gran apoyo incondicional, por saber que siempre puedo y podré contar contigo, por ser uno de los pilares de mi vida...mil millones de gracias. A mi hermano David, por nuestros años en León, por tu inconfundible tranquilidad, por tu forma de ser, por tu optimismo y por valorar las pequeñas cosas de la vida. A mi hermano Abel, por haber confiado y creído siempre en mí y porque a pesar de no entender el mundo de la investigación ha sabido que lo conseguiría. A Joselus y Belén, que siempre han estado muy al tanto de mis avances y sobre todo a las cuatro estrellas de la casa: Izan, Nora, Abelín y Lara, que son lo mejor de lo mejor. A Carmina, por su contribución en mi formación académica y por su apreciada ayuda.

A mis padres, por inculcarme el esfuerzo y la humildad y por todo lo que han tenido que luchar y sacrificar para que yo pudiese realizar mis sueños.

A Poldo y Milina por haberse sentido siempre tan orgullosos de mí.

Mi mayor agradecimiento se lo debo a Víctor, por compartirlo todo conmigo. Esta tesis debería llevar también tu nombre porque sin ti no lo habría conseguido. Gracias por aguantarme y ayudarme en todo sin que yo te lo pida y por confiar en mí más que yo misma. Gracias por estar siempre a mi lado, a las duras y a las maduras, por hacerme cada día más feliz y porque después de tanto tiempo no has perdido ni un ápice de la ilusión ni de la pasión con la que comenzamos nuestra vida juntos...GRACIAS.

*Dale vida a los sueños que alimentan el alma,
no los confundas nunca con realidades vanas.
Y aunque tu mente sienta necesidad, humana,
de conseguir las metas y de escalar montañas,
nunca rompas tus sueños, porque matas el alma.*

*Dale vida a tus sueños aunque te llamen loco,
no los dejes que mueran de hastío, poco a poco,
no les rompas las alas, que son de fantasía,
y déjalos que vuelen contigo en compañía.*

*Dale vida a tus sueños y, con ellos volando,
tocarás las estrellas y el viento, susurrando,
te contará secretos que para ti ha guardado
y sentirás el cuerpo con caricias, bañado,
del alma que despierta para estar a tu lado.*

*Dale vida a los sueños que tienes escondidos,
descubrirás que puedes vivir estos momentos
con los ojos abiertos y los miedos dormidos,
con los ojos cerrados y los sueños despiertos.*

Mario Benedetti

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	7
SUMMARY	23
INTRODUCCIÓN	37
1 CONTROL DEL APETITO Y OBESIDAD	39
1.1 Hambre, apetito y saciedad	39
1.2 Regulación del balance energético por el sistema nervioso central	40
1.2.1 Neuropeptidos orexigénicos secretados por el hipotálamo	45
1.2.2 Neuropeptidos anorexigénicos secretados por el hipotálamo	46
1.3 Regulación de la ingesta por tejidos periféricos	47
2 SISTEMAS SENSORES DE GLUCOSA EN EL CONTROL DE LA INGESTA. DIFERENCIAS ENTRE EL VMH Y LH	52
2.1 Sistemas sensores de glucosa	52
2.2 Sensores de glucosa en el cerebro	54
3 OTROS SENSORES METABÓLICOS: AMPK, mTOR/S6K Y PASK	58
3.1 Vía mTOR/S6K. Regulación y función	59
3.1.1 Sustratos celulares y funciones de la vía de señalización mTOR/S6K1	60
3.1.2 S6K. Estructura y regulación celular	63
3.1.3 La vía de señalización mTOR/S6K1 en el control de la ingesta	67
3.1.4 La vía de señalización mTOR/S6K1 en condiciones patológicas	68
3.2 Vía AMPK. Regulación y función	69
3.2.1 AMPK. Estructura y regulación celular	69
3.2.2 Papel de la AMPK en tejidos periféricos	75
3.2.3 Papel de la AMPK hipotalámica en el control de la ingesta	79
3.2.4 AMPK como diana de drogas, hormonas, nutrientes y otros ligandos extracelulares	82
3.3 Papel de la vía mTOR/S6K1 y AMPK hipotalámicas en la regulación de la ingesta	85
3.4 PASK. Regulación y función	86
3.4.1 PASK. Estructura y regulación celular	87
3.4.2 Sustratos celulares y funciones de la PASK	89
3.4.3 Papel de la PASK como sensor de glucosa	91
4 GLP-1 Y SU IMPLICACIÓN EN LA INGESTA	94
4.1 Familia de los péptidos semejantes al glucagón. Estructura y procesamiento del proglucagón	94
4.2 Secreción y metabolismo del GLP-1	95
4.3 Mecanismo de acción y efectos fisiológicos del GLP-1	96
4.3.1 Mecanismo de acción del GLP-1	96
4.3.2 Efectos del GLP-1 en el tracto gastrointestinal	98
4.3.3 Efectos del GLP-1 en el páncreas	99

4.4	Papel del GLP-1 en el control de la ingesta	101
4.5	GLP-1 y sus implicaciones en obesidad y diabetes.	102

OBJETIVOS	105
------------------------	------------

METODOLOGÍA Y RESULTADOS	109
---------------------------------------	------------

1	ARTICULO 1. EL PÉPTIDO SEMEJANTE AL GLUCAGÓN 1 (GLP-1) PUEDE REVERTIR LAS ACTIVIDADES DE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP (AMPK) Y DE LA QUINASA DE LA PROTEÍNA S6 RIBOSOMAL (P70S6K) INDUCIDAS POR FLUCTUACIONES EN LOS NIVELES DE GLUCOSA EN ÁREAS HIPOTALÁMICAS IMPLICADAS EN EL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO	113
2	ARTÍCULO 2. LA QUINASA CON DOMINIOS PAS ES UN SENSOR DE NUTRIENTES EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA E HIPOTALÁMICAS NECESARIO PARA MANTENER LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD NORMALES DE OTROS SENSORES CELULARES DE NUTRIENTES Y DE ENERGÍA.....	135
3	ARTÍCULO 3. LA QUINASA CON DOMINIOS PAS ES UN SENSOR DE NUTRIENTES Y DE ENERGÍA EN ÁREAS HIPOTALÁMICAS NECESARIO PARA MANTENER LA FUNCIÓN NORMAL DE AMPK Y mTOR/S6K1.....	159

DISCUSIÓN	177
------------------------	------------

CONCLUSIONES	211
---------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	215
---------------------------	------------

ANEXOS	231
---------------------	------------

3V	Tercer ventrículo
ACC	Acetil CoA carboxilasa
AgRP	Proteína relacionada con agouti
AICAR	5 Aminoimidazol 4 carboxamida ribósido
Akt	Proteína quinasa B. También denominada PKB
AMPc	AMP cíclico
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
ANOVA	Análisis de la varianza
ARC	Núcleo arqueado
CaMK	Quinasa dependiente de calcio y calmodulina
CaMKKβ	Quinasa de la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina β
CART	Transcritos regulados por cocaína y anfetaminas
CCK	Colecistoquinina
CPT1	Carnitina palmitoil transferasa 1
DAPI	4,6 Diamidino 2 fenilindol
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMH	Hipotálamo dorsomedial
DMN	Núcleo hipotalámico dorsomedial
DPP-4	Dipeptidil peptidasa 4
eEF1-α1	Factor de elongación eucariótico 1 α 1
eEF-2K	Quinasa del factor de elongación eucariótico 2
eIF-4B	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 4B
eIF4E-BPs	Proteínas de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E
ENS	Sistema nervioso entérico
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares. También denominada MAPK
Ex-4	Exendina-4
FBS	Suero fetal bovino
GAL	Galanina
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
GE	Neuronas estimuladas por incremento en los niveles de glucosa
Ghr	Grelina
GI	Neuronas inhibidas por incremento en los niveles de glucosa

GIP	Polipéptido inhibidor gástrico
GK	Glucoquinasa
GLP-1	Péptido semejante al glucagón 1
GLP-1R	Receptor del péptido semejante al glucagón 1
GLUT	Transportador de glucosa
GS	Glucógeno sintasa
GSK3β	Glucógeno sintasa quinasa 3 β
HIPK2	Proteína quinasa 2 que interacciona con homeodominios
icv	Intracerebroventricular
IRS	Sustrato del receptor de la insulina
LH	Hipotálamo lateral
LKB1	Quinasa hepática B1
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos. También denominada ERK
MC	Melanocortina
MCH	Hormona concentradora de melanina
MEK	Proteína quinasa de las MAPKs.
mTOR	Del inglés " <i>Mammalian target of rapamycin</i> "
α-MSH	α -Melanotropina
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NPY	Neuropéptido Y
NSG	Neuronas sensibles a glucosa
NTS	Núcleo del tracto solitario
Orex	Orexina
OXM	Oxintomodulina
PAS	Per-Arnt-Sim
PASK	Quinasa con dominios PAS
<i>Pask</i>^{-/-}	Ratones C57Bl6/J deficientes en PASK
PDK1	Proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1
<i>Pdk1</i>	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
PDX-1	Del inglés " <i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i> "
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa
PGC1α	Coactivador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ

PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PIP3	Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
PKARIIα	Subunidad reguladora $\alpha 2$ de proteína quinasa dependiente de AMPc cíclico
PKC	Proteína quinasa C
POMC	Pro-opiomelanocortina
PP	Polipéptido pancreático
PP1	Proteína fosfatasa 1
PP2B	Proteína fosfatasa 2B
PP2Cα	Proteína fosfatasa 2C α
PTEN	Fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato 3 fosfatasa
PVN	Núcleo paraventricular
PYY	Péptido tirosina tirosina ó péptido YY
RAPTOR	Del ingles " <i>Regulatory-associated protein of mTOR</i> "
Rheb	Proteína homóloga de Ras enriquecida en cerebro
RICTOR	Del ingles " <i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i> "
RIPA	Del ingles " <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> "
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
S6	Proteína S6 ribosomal
S6K1	Quinasa de la proteína ribosomal S6, subunidad de 70 KDa (p70-S6K)
SF1	Factor esteroideogénico 1
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
TSC2	Complejo de la esclerosis tuberosa 2
UCP-2	Proteína desacoplante 2
Ugp	UDP-glucosa pirofosforilasa
VMH	Hipotálamo ventromedial
WT	Tipo silvestre

RESUMEN

1 INTRODUCCIÓN

Las complicaciones causadas por el sobrepeso, la obesidad y la diabetes tipo 2 se encuentran entre las principales razones del aumento de la morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. Los cambios en la disponibilidad de nutrientes y la secreción de péptidos orexigénicos o anorexigénicos en respuesta a esa variabilidad bien activan o inhiben las vías de señalización hipotalámicas que regulan la ingesta de alimentos.

Distintas áreas hipotalámicas juegan un papel importante en el control de la alimentación y de la homeostasis energética. A mediados del siglo 20 se registraron los primeros indicios de que la estimulación eléctrica del hipotálamo ventromedial (VMH) suprimía la ingesta de alimentos y que las lesiones bilaterales de estas áreas inducían hiperfagia y obesidad. Por tanto, el hipotálamo ventromedial fue llamado el centro de la saciedad. Por el contrario, alteraciones producidas en el área hipotalámica lateral (LH) inducían respuestas contrarias y, por ello, el LH fue denominado centro del hambre. Estas áreas, junto con otras, secretan péptidos orexigénicos y anorexigénicos, configurando una red de señales que coordinan la ingesta de alimentos y la homeostasis energética.

Se han descrito al menos dos tipos de neuronas sensoras de glucosa en el cerebro: las neuronas estimuladas por glucosa, que se encuentran principalmente en el hipotálamo ventromedial y son excitadas por el aumento de los niveles de glucosa en el espacio extracelular, y las neuronas inhibidas por la glucosa (principalmente presentes en el LH), que son estimuladas por una disminución en las concentraciones de glucosa.

Se ha establecido una relación directa entre la regulación de la ingesta de alimentos y la homeostasis energética, y las actividades de sensores metabólicos hipotalámicos. Con el fin de garantizar un estado equilibrado de energía celular, existen ciertos sensores de nutrientes y de energía en lugares clave. Algunos ejemplos de proteínas que ayudan a detectar la energía celular e integran las señales hormonales y de nutrientes con el fin de mantener la homeostasis energética en el organismo son: la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK), el complejo mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*), y su sustrato directo, la quinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K1). Por otra parte, la quinasa con dominios

PAS (PASK) se ha caracterizado como un sensor de nutrientes en tejidos periféricos.

La actividad de la AMPK está regulada por fluctuaciones en la energía celular, producidas por el estado nutricional o por el estrés metabólico, que reducen la producción de ATP. La activación de AMPK se produce como consecuencia de un incremento en el ratio AMP/ATP en estados de depleción energética. Una vez activada, la AMPK ayuda a restaurar el balance energético (Hardie et al., 1998; Rutter et al., 2003). Por el contrario, mTOR/S6K1 responde a elevados niveles de nutrientes y hormonas que promueven los procesos anabólicos y el crecimiento celular (Alessi et al., 2009; Foster and Fingar, 2010; Gingras et al., 2001; Proud, 2002; Zoncu et al., 2011). Por lo tanto, AMPK y mTOR responden a los cambios en la concentración de glucosa y otros nutrientes de una forma coordinada y en direcciones opuestas. Por otra parte, estudios iniciales han demostrado que PASK podría actuar como un sensor de nutrientes y regulador del metabolismo de la glucosa y la energía celular en los tejidos periféricos. Investigaciones posteriores indican que ratones deficientes en PASK son resistentes a la obesidad inducida por la dieta, por lo que el papel de PASK (que no había sido descrito hasta ahora en el hipotálamo) podría ser similar al de otros sensores metabólicos más conocidos como la AMPK y mTOR.

Ambos sensores metabólicos y los péptidos anorexigénicos y orexigénicos actúan de forma coordinada para controlar con precisión el comportamiento alimentario y el metabolismo energético. Hemos descrito anteriormente que el péptido similar al glucagón (GLP-1) es un péptido anorexigénico (Alvarez et al., 1996; Blazquez et al., 1998; Navarro et al., 1996; Rodriquez de Fonseca et al., 2000; Turton et al., 1996) que también reduce el metabolismo cerebral de la glucosa en el hipotálamo y en el tronco cerebral humano (Alvarez et al., 2005). Además, el GLP-1 conduce a una reducción en la ingesta de alimentos y agua y, en consecuencia, a la pérdida de peso. Este péptido también tiene diversas actividades biológicas que afectan a los tejidos periféricos, además de al SNC. Así, por ejemplo, el GLP-1 estimula la secreción de insulina del páncreas de una manera dependiente de la glucosa después de las comidas, de ahí su denominación como una hormona “incretina”. El GLP-1 es secretado por las células L intestinales después de la ingestión de nutrientes, sin embargo, su vida media es muy corta debido a las acciones de la dipeptidil peptidasa 4. Por este motivo, en la práctica clínica se

utilizan agonistas del receptor de GLP- 1 con una vida media más larga, como la exendina-4, que se utiliza como un agente hipoglucémico oral (Niswender, 2010). Además, la administración de exendina-4 en ratas Zucker obesas (que desarrollan resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hiperlipidemia) reduce la ingesta de alimentos y provoca la pérdida de peso, al igual que en las ratas delgadas (Blonde et al., 2006; Buse et al., 2009; Montanya and Sesti, 2009; Rodriquez de Fonseca et al., 2000).

Estas acciones del GLP-1 en el páncreas y en el sistema nervioso central se logran a través de receptores de GLP-1 (GLP-1R) que comparten la misma secuencia genética en ambos tejidos. El primer sistema sensor de glucosa fue descrito en células β -pancreáticas y estaba integrado por la glucoquinasa (GK), el transportador de glucosa 2 (GLUT-2) y el GLP-1R. Posteriormente, se observó una co-expresión del GLP-1R junto con la glucoquinasa y el GLUT-2 en las células hipotalámicas ubicadas en áreas que participan en el comportamiento alimentario, lo que sugería la presencia de un sistema sensor de glucosa en el cerebro similar al de las células β -pancreáticas (Alvarez et al., 2002; Navarro et al., 1996; Roncero et al., 2004; Roncero et al., 2000). En resumen, debido a su acción en el páncreas, el GLP-1 es un agente antidiabetogénico, mientras que su acción en las áreas hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta ayuda a generar un estado de saciedad.

El aumento de la prevalencia de la diabetes tipo 2 y la obesidad en los últimos años pone de relieve la importancia de desarrollar terapias para integrar el control de la glucemia y la ingesta de alimentos. Además del GLP-1, la AMPK ha sido propuesta como otra posible diana para el desarrollo de fármacos hipoglucemiantes. Por todo ello, hemos estudiado: i) el papel de PASK como un sensor de nutrientes en las áreas hipotalámicas involucradas en la conducta alimentaria, ii) los efectos del GLP-1/exendina-4 sobre las vías de la AMPK, PASK y mTOR/S6K1 en las áreas VMH y LH y iii) la importancia de la deficiencia de PASK en estas vías de señalización.

2 OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis ha sido analizar el papel de la PASK en el mecanismo sensor de nutrientes y estudiar la capacidad del GLP-1 o su análogo, la exendina-4, de modular la expresión y actividad de estos sensores de nutrientes (AMPK, mTOR/S6K1 y PASK) en las áreas hipotalámicas involucradas en la regulación del comportamiento alimentario (VMH and LH).

3 RESULTADOS

3.1 El péptido semejante al glucagón 1 (GLP-1) puede revertir las actividades de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) y de la quinasa de la proteína S6 ribosomal (S6K1) inducidas por fluctuaciones en los niveles de glucosa

Se estudiaron los efectos coordinados de la glucosa y del GLP-1 sobre la expresión y actividades de la AMPK y S6K1 en el VMH y LH (áreas hipotalámicas involucradas en el comportamiento alimentario). En primer lugar, este enfoque fue desarrollado mediante ensayos *in vitro*, utilizando cortes de explantes hipotalámicos o bien en cultivos de líneas celulares (GT1-7 y N2A) expuestos a concentraciones de baja y alta glucosa e incubados con GLP-1. El enfoque experimental fue desarrollado detectando el nivel de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real y por la cuantificación de la actividad de las proteínas (niveles de fosforilación) mediante inmunodetección.

En segundo lugar, se utilizó un sistema de ensayo *in vivo* para analizar la respuesta de la AMPK y S6K1 en los animales obesos y los efectos de la exendina-4 en la actividad de la AMPK y S6K1 hipotalámicas en ratas Zucker obesas y controles delgadas. Los animales se sacrificaron 1 h después de que se administrara una inyección de exendina-4 a ratas ayunadas durante 48 h o después de ser re-alimentadas durante 2-4 horas.

3.1.1 Modulación por glucosa y GLP-1 de las actividades de AMPK y S6K1 en líneas celulares de neuroblastoma N2A e hipotalámicas GT1-7

En base a nuestros resultados, el grado de fosforilación de AMPK a diferentes concentraciones de glucosa fue significativamente diferente cuando los

lisados celulares se sometieron o no a irradiación por microondas. Nuestros datos sugieren que el mecanismo utilizado para procesar los extractos celulares era un paso determinante para la obtención de resultados reproducibles. La exposición a irradiación de microondas durante 5-10 s inmediatamente después de la adición del tampón de lisis celular resultó ser el método más eficiente para mantener el estado de fosforilación de las proteínas.

La actividad de AMPK aumentó y la de la S6K1 disminuyó a bajas y altas concentraciones de glucosa respectivamente, y su activación se produjo de una manera dependiente del tiempo de incubación, así la AMPK requirió menos tiempo (2 h) que la S6K1 (4 h). En estas condiciones, el tratamiento con GLP-1 revirtió los efectos de la glucosa sobre la activación de ambas quinasas.

Con el fin de estudiar los intermediarios que podrían estar involucrados en el mecanismo de señalización iniciado por el GLP-1R, y que podrían estar mediando la regulación de los sensores metabólicos hipotalámicos, se utilizaron inhibidores específicos de diferentes proteínas quinasas y fosfatasas en la línea celular N2A. Los resultados muestran que tanto las proteínas fosfatasas PP1 y PP2B y las proteínas quinasas PKA, PKC y de PI3K, pueden estar mediando las acciones del GLP-1 sobre la actividad de AMPK, mientras que la PI3K, mTOR y la PKA mediaban las acciones de la alta concentración de glucosa y del GLP-1 sobre la actividad de S6K1.

3.1.2 Las vías de señalización de AMPK y mTOR/S6K1 son reguladas en VMH y LH en respuesta al estado nutricional y moduladas por el péptido anorexigénico GLP-1/exendina-4 en ratas Zucker obesas y controles delgadas

La glucosa y el GLP-1 regulan la expresión de AMPK en explantes hipotalámicos. Así, a concentraciones elevadas de glucosa (10 mM) se produjo una reducción de la expresión del ARNm que codifica para AMPK α 2 en el LH, y el GLP-1 fue capaz de recuperar la expresión de la AMPK.

Además, las actividades de AMPK aumentaron y las de la S6K1 disminuyeron a concentraciones bajas y altas de glucosa respectivamente, tanto en el VMH como en el LH, y el tratamiento con GLP-1 revirtió los efectos de la glucosa en ambas quinasas.

Utilizando un modelo *in vivo* de obesidad, se observó que la restricción de alimentos activó la AMPK en las áreas VMH y LH, tanto en ratas Zucker obesas como en controles delgadas. Sin embargo, la actividad de la AMPK en ambas áreas fue menor en las ratas obesas respecto a las delgadas. Además, la re-alimentación redujo la actividad de la quinasa en estas regiones hipotalámicas. Por otro lado, la exendina-4 reguló las actividades de AMPK y S6K1 hipotalámicas en ambos grupos de animales. Así, la exendina-4 revirtió el efecto del ayuno sobre la actividad de la AMPK en las ratas delgadas, pero no fue capaz de hacerlo en obesas. También se analizó la actividad de S6K1 en las mismas condiciones. El tratamiento de 2 horas de re-alimentación redujo la actividad de S6K1 en ambas áreas, mientras que en ratas re-alimentadas durante 4 h la actividad de esta quinasa aumentó en comparación con la de aquellas que habían sido re-alimentadas durante 2 h. El efecto de la administración de exendina-4 en ratas ayunadas no modificó significativamente la actividad de S6K1, sin embargo, después de 2 h de re-alimentación la exendina-4 aumentó su actividad en el VMH y LH en todos los grupos animales. Sin embargo, el efecto de la exendina-4 en la actividad de S6K1 en el VMH difería entre las ratas obesas y delgadas. Así, el tratamiento con exendina-4 en ratas delgadas y obesas re-alimentadas durante 4 horas no modificaba significativamente la actividad de S6K1 en el LH, pero la reducía en el VMH de ratas delgadas, no así en las Zucker obesas.

En los últimos años, la AMPK se ha propuesto como un sensor de energía celular que integra muchas señales reguladoras y cambios ambientales nutricionales y que también está involucrada en el mantenimiento del balance energético de todo el cuerpo (Hardie et al., 2006). Se ha descrito que la regulación de la actividad de la AMPK localizada en las áreas hipotalámicas involucradas en el control del comportamiento alimentario puede ser un mecanismo para la detección de variaciones nutricionales, por ejemplo, los niveles de glucosa (Mountjoy and Rutter, 2007). Por otro lado, mTOR es una de las dianas de la AMPK y las concentraciones elevadas de glucosa activan la vía mTOR/S6K1 e inhiben la ingesta de alimentos.

En esta tesis se confirma que los efectos de la glucosa en la AMPK y mTOR/S6K1 son específicos del área hipotalámica y opuestos sobre el control de la conducta alimentaria. Estos efectos se encontraron tanto *in vitro*, utilizando rodajas hipotalámicas, como *in vivo*, en ratas Zucker obesas y controles delgadas. También

mostramos que ciertas funciones del GLP-1 (descrito como un agente anorexigénico y antidiabetogénico) pueden estar mediadas por la regulación de los dos sensores de nutrientes hipotalámicos. De este modo, se observó que las vías de señalización de AMPK y mTOR/S6K1 responden a cambios en las concentraciones de glucosa y que el tratamiento con GLP-1 revierte los efectos de la glucosa.

Se ha publicado que los péptidos anorexigénicos disminuyen la actividad de AMPK α 2 (Andersson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004), mientras que otros péptidos, tales como la insulina y la leptina, aumentan la fosforilación de S6K1 (Cota et al., 2006). En nuestro estudio, el GLP-1 también modula las actividades de AMPK y mTOR/S6K1 en el VMH y LH, y lo hace produciendo una respuesta distinta en el LH en comparación con el VMH. Este resultado se puede explicar en base a los diferentes roles que juegan estas dos áreas en el control de la ingesta de alimentos, ya que previamente habían sido definidas como centros de hambre y saciedad, respectivamente.

3.2 La quinasa con dominios PAS (PASK) es un sensor de nutrientes en células N2A y en el hipotálamo. PASK es necesaria para mantener la expresión y actividad normales de otros sensores de nutrientes y energéticos celulares

Se estudió el efecto de la glucosa y del GLP-1 sobre la expresión de PASK y se analizó si el silenciamiento de PASK alteraba el mecanismo sensor de glucosa. En consecuencia, se determinó la presencia de PASK en células y áreas hipotalámicas involucradas en el control de la ingesta de alimentos, tales como el VMH y LH. Además, se estudió el efecto del silenciamiento de PASK en la expresión de varios genes, así como el efecto sobre los otros sensores de nutrientes mediante el análisis de la expresión y la actividad de intermediarios de las vías de AMPK y mTOR/S6K1.

Se utilizaron dos modelos experimentales para este propósito: un enfoque *in vitro* utilizando cultivos organotípicos de rodajas hipotalámicas y la línea celular N2A (neuroblastoma de ratón). Además, utilizamos ARNs de interferencia para silenciar la proteína PASK y estudiar su función en el mecanismo sensor de glucosa. Asimismo, se utilizaron ratones deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) para investigar *in vivo* el papel de PASK en las áreas hipotalámicas involucradas en el comportamiento alimentario y su función en el mecanismo sensor de nutrientes.

3.2.1 *La PASK es un sensor de nutrientes y energía en células de neuroblastoma y en áreas hipotalámicas (VMH Y LH) y se encuentra modulada por GLP-1*

Mediante las técnicas de hibridación *in situ* o tinción con X-gal, encontramos células positivas para PASK en las áreas VMH Y LH, así como en otras áreas del hipotálamo (por ejemplo, núcleo arqueado, núcleo paraventricular y dorsomedial). Además, las células de neuroblastoma N2A también expresan PASK.

La expresión de *Pask* es dependiente de la concentración de glucosa en el medio extracelular. Por lo tanto, en cultivos organotípicos de rodajas hipotalámicas, concentraciones elevadas de glucosa disminuyeron un ~ 20 y 66% la expresión del ARNm que codifica para PASK en las áreas VMH y LH, respectivamente. La presencia de GLP-1 disminuyó el ARNm de esta quinasa y revirtió parcialmente el efecto de las elevadas concentraciones de glucosa en el LH. Efectos similares fueron observados en las células N2A. Sin embargo, en las células silenciadas para PASK se observó una disminución del 77% en los niveles de ARNm de esta quinasa, y su expresión no se alteró ni por glucosa ni por GLP-1.

3.2.2 *La PASK es necesaria para la expresión normal de ciertos genes y para la respuesta a la glucosa y GLP-1*

El silenciamiento de *Pask* en células N2A alteró la expresión de ciertos genes en respuesta a la glucosa o al GLP-1. Así, la expresión de ARNm que codifica para la quinasa hepática B1 (LKB1), una de las quinasas que fosforilan a la AMPK, se alteró en células silenciadas para PASK. En las células control la expresión de *Lkb1* se incrementó a concentraciones bajas de glucosa y la presencia de GLP-1 revirtió dicho efecto. Sin embargo, la expresión de ARNm que codifica para LKB1 disminuyó en las células silenciadas para PASK y no respondió a la glucosa o al GLP-1. El efecto de la deficiencia de PASK en la expresión de genes en las áreas VMH y LH de ratón parece ser diferente. Ratones deficientes en PASK presentaron un nivel de expresión de *Ampka2* menor en el VMH respecto a los ratones silvestres, y una tendencia similar se observó en el LH. Por el contrario, los niveles de ARNm de la proteína quinasa 2 que interactúa con homeodominios (*Hipk2*) (un mediador de las vías apoptóticas en las neuronas) fueron mayores en el LH de ratones deficientes en PASK y no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *Lkb1*. De acuerdo con los datos observados en células de neuroblastoma, el efecto de la exendina-4 en la expresión de genes se perdió. Por lo

tanto, la ausencia del efecto de la exendina-4 en ratones deficientes en PASK explica la disminución de los niveles de expresión de varios genes que codifican para las proteínas: LKB1, complejo de la esclerosis tuberosa 2 (TSC2), proteína quinasa B (PKB o Akt), mTOR, factor de elongación eucariótico 1 alfa 1 (eEF1- α 1) y óxido nítrico sintasa neuronal 1 (nNOS1) en el hipotálamo ventromedial de los ratones deficientes en PASK, en comparación con sus homólogos de tipo silvestre.

3.2.3 La PASK es necesaria para la detección normal de nutrientes por la AMPK y mTOR/S6K1 en células de neuroblastoma y en las áreas del hipotálamo (VMH y LH)

Como se ha indicado anteriormente, la actividad de AMPK en células de neuroblastoma aumentó a concentraciones bajas de glucosa, mientras que el GLP-1 bloqueó este efecto. Sin embargo, ni los efectos de la glucosa ni los del GLP-1 se observaron en las células silenciadas para la PASK.

Los niveles bajos de glucosa en las células silenciadas para la PASK muestran una correlación entre una mayor concentración de ATP, baja expresión del ARNm que codifica para LKB1 y la ausencia de activación de AMPK.

Además, el nivel de AMPK α 2 total disminuyó en presencia de altos niveles de glucosa en células de neuroblastoma control, y el efecto de la glucosa se perdió en las células silenciadas para la PASK. La activación de AMPK está asociada con el aumento de la fosforilación de su diana, la acetil-CoA carboxilasa (ACC). El nivel de fosforilación de ACC siguió un patrón similar a la AMPK en respuesta a la glucosa y al GLP-1, y el silenciamiento del gen *Pask* bloqueó una vez más estas respuestas.

Por otra parte, también se alteró la respuesta de mTOR/S6K1. Se observó que la activación de S6K1 se producía a elevadas concentraciones de glucosa y que el GLP-1 reducía significativamente la activación de S6K1 en las células de neuroblastoma. Sin embargo, las células silenciadas para PASK registraron la pérdida completa de la capacidad de S6K1 para detectar los niveles de nutrientes y responder a GLP-1.

En el caso de los ratones deficientes en PASK, la respuesta de los sensores metabólicos tanto a los nutrientes bajo condiciones de ayuno o re-alimentación como a la exendina-4 también estaba alterada en las áreas VMH y LH.

La máxima actividad de la AMPK se observó sólo en el estado de ayuno en el VMH y LH de los ratones de tipo silvestre. Sin embargo, la actividad de la AMPK también fue elevada en los ratones re-alimentados *Pask*^{-/-}. El aumento de la actividad de AMPK después del ayuno fue revertido por la administración de exendina-4, específicamente en el LH en ratones de tipo silvestre, pero este efecto se perdió en ratones deficientes en PASK.

Por el contrario, la re-alimentación incrementó la actividad de S6K1 significativamente en el LH y resultados similares fueron observados en el VMH, aunque no se registraron diferencias significativas. Sin embargo, la actividad de S6K1 estaba elevada en ratones deficientes en PASK tanto en ayunas como condiciones de re-alimentación. La exendina-4 aumentó la actividad de S6K1 en condiciones de ayuno y la disminuyó cuando los ratones de tipo silvestre se re-alimentaron. No obstante, el efecto de la exendina-4 en la actividad de S6K1 se perdió en ratones *Pask*^{-/-}.

La pérdida del efecto del estado nutricional y del GLP-1 en la activación/inhibición de AMPK y S6K1 no fue específica del hipotálamo, así en el hígado también estaba alterada la respuesta de estos sensores en ratones *Pask*^{-/-}.

3.2.4 Los ratones deficientes en PASK registran alteraciones del efecto anorexigénico y de la glucemia en respuesta al tratamiento subcutáneo con exendina-4

La exendina-4 tiene un efecto anorexigénico en la ingesta de alimentos, pero también es un agente antidiabetogénico. Por esta razón, uno de nuestros objetivos era comprobar si los efectos del GLP-1 estaban mediados por PASK. Por lo tanto, analizamos el impacto sobre la ingesta tras la administración subcutánea de exendina-4 en ratones deficientes en PASK. El efecto anorexigénico de la exendina-4 fue más potente en ratones de tipo silvestre que en ratones deficientes en PASK, pero sólo después de 60 minutos de re-alimentación. En paralelo, los niveles de glucosa en sangre aumentaron significativamente después de 3 horas de re-alimentación en ratones silvestres y deficientes en PASK, en comparación con animales en ayunas, si bien los niveles circulantes de glucosa en animales en ayunas y re-alimentados fueron similares en ambos tipos de ratones. El tratamiento con exendina-4 disminuyó los niveles de glucosa en animales ayunados y re-alimentados, pero una vez más, este efecto fue menor en ratones *Pask*^{-/-}. Por tanto,

existe una concordancia entre la menor disminución de los niveles de glucosa en sangre después del tratamiento con exendina-4 en animales re-alimentados y la pérdida del efecto anorexigénico de este péptido en ratones *Pask*^{-/-}. Sin embargo, no se observaron cambios en la capacidad de la exendina-4 para modular los niveles de insulina en ratones de tipo silvestre o ratones deficientes en PASK.

En los últimos años, además de los sensores de nutrientes AMPK y mTOR/S6K1, se ha descrito a la PASK como un sensor de nutrientes que podría tener un papel similar a estos. Aunque la función de PASK se ha descrito en células pancreáticas, el papel de esta quinasa en la detección de nutrientes a nivel hipotalámico es desconocido. La importancia de PASK y su relación con enfermedades tales como la obesidad proviene del hecho de que los ratones con deficiencia de PASK son resistentes al desarrollo de la obesidad por dietas ricas en grasa. Por lo tanto, PASK también podría estar implicada en la obesidad y en la diabetes tipo 2, tanto directamente como a través de su capacidad para alterar la respuesta de los otros sensores de nutrientes, como la AMPK y mTOR/S6K1. Generalmente se acepta que las vías AMPK y mTOR/S6K1 responden a cambios en la glucosa y otros nutrientes en direcciones opuestas y sus efectos sobre la regulación de la ingesta de alimentos pueden solaparse. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la AMPK y mTOR en ratones *Pask*^{-/-} se activan simultáneamente en las áreas que participan en el control de la ingesta de alimentos, lo que sugiere que la función de PASK podría ser crítica para la regulación de la activación/inhibición de ambas vías. Además, estos ratones *Pask*^{-/-} pierden los efectos que ejercen la exendina-4/GLP-1 en la actividad de las vías de AMPK y mTOR/S6K1, lo que sugiere que PASK es una de las quinasas clave requerida para las acciones de GLP-1. Dado que el GLP-1 es un péptido anorexigénico, cuyo nivel aumenta después de la alimentación informando al sistema nervioso central del estado nutricional, es razonable suponer que PASK puede estar implicada en el control de la ingesta de alimentos. Curiosamente, nuestros datos muestran que el efecto anorexigénico de la exendina-4 se redujo en ratones *Pask*^{-/-}, de conformidad con los niveles de glucosa en sangre significativamente más altos encontrados después del tratamiento con exendina-4 en ratones *Pask*^{-/-} re-alimentados.

Postulamos que el papel de PASK podría ser crítico para el funcionamiento normal de los sensores estudiados y que la desregulación de estas vías de

señalización podría estar involucrada en el desarrollo de la obesidad y la diabetes tipo 2. En este sentido, se ha descrito una mutación en el gen *Pask* que produce diabetes temprana o diabetes tipo MODY (Semplici et al., 2011), y también se ha observado una disminución en la expresión de PASK en los islotes pancreáticos de pacientes con diabetes tipo 2. Estos datos parecen contradecir la resistencia al desarrollo de la obesidad por dietas ricas en grasa de los ratones deficientes en PASK (Hao et al., 2007). Sin embargo, la interpretación de los fenotipos en estos ratones es difícil debido a la redundancia de mecanismos reguladores. Nuestros estudios *in vitro*, donde los mecanismos compensatorios son limitados, apoyan los datos obtenidos *in vivo* y revelan el papel de PASK como un sensor de nutrientes en células de neuroblastoma e hipotalámicas, así como su papel clave para la capacidad de detección de nutrientes de otros sensores metabólicos, tales como las vías AMPK y mTOR/S6K1.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo indican que en las áreas VMH y LH el GLP-1 modula el estado de activación de la AMPK y mTOR/S6K1 en respuesta a las variaciones fisiológicas de nutrientes o por estados patológicos tales como la obesidad y la resistencia a la insulina. Es más, los datos obtenidos sugieren un posible papel del GLP-1 o exendina-4 como protector de las actividades de la AMPK y mTOR/S6K1 en el hipotálamo en ciertos estados patológicos. Además, se presenta la evidencia experimental que demuestra que PASK es un sensor de nutrientes en las áreas hipotalámicas involucradas en el comportamiento alimentario y que la función de PASK es decisiva para mantener el efecto de los nutrientes y del GLP-1 sobre las vías AMPK y mTOR/S6K1 hipotalámicas implicadas en el control de la ingesta y la homeostasis energética.

4 CONCLUSIONES

El GLP-1/exendina-4 modula el estado de activación de la AMPK y mTOR/S6K1 en el VMH y LH. Este péptido anorexigénico revierte el efecto activador/inhibidor en respuesta a estados nutricionales fisiológicos y a estados fisiopatológicos, reforzando de esta manera el potencial terapéutico de la exendina-4 en condiciones fisiopatológicas, como la obesidad y la diabetes, mientras que ayuda a lograr un equilibrio adecuado en la actividad de los sensores metabólicos hipotalámicos mediante la integración de señales nutricionales y hormonales para mantener la homeostasis energética.

La PASK es un sensor de nutrientes y hormonal en las áreas VMH y LH en ratas, así como en células de neuroblastoma, y también es una quinasa clave en las acciones del GLP-1. La inactivación de PASK altera la capacidad de detección de glucosa de otros sensores metabólicos (vías de AMPK y mTOR/S6K1). Estos sensores metabólicos en el cerebro han sido directamente relacionados con la regulación de la ingesta, peso corporal y homeostasis energética, sugiriendo que PASK podría también jugar un papel en el comportamiento alimentario.

Nuestros datos indican que la función de PASK podría ser crítica para el mantenimiento del mecanismo de los sensores de nutrientes de AMPK y mTOR/S6K1 en áreas hipotalámicas involucradas en la ingesta, así como para el mantenimiento de la función reguladora de la exendina-4 en el control de la ingesta. Algunos de los efectos anorexigénicos o antidiabetogénicos de la exendina-4 podrían estar modulados por PASK.

SUMMARY

1 INTRODUCTION

The complications caused by overweight, obesity and type 2 diabetes are among the main reasons for the increase in morbidity and mortality in developed countries. Changes in nutrient availability and the secretion of orexigenic or anorexigenic peptides in opposite directions either activate or inhibit the hypothalamic signal pathways that regulate food intake.

Hypothalamic areas play an important role in the control of feeding and energy homeostasis. The mid-20th century recorded the first indications that the electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus (VMH) suppressed food intake, and that the bilateral lesions of these areas induced hyperphagia and obesity. The VMH was therefore called the satiety center. In contrast, alterations in the lateral hypothalamic area (LH) induced the opposite set of responses, and the LH was hence called the hunger center. These areas, together with others, secrete orexigenic and anorexigenic peptides, which configure a network of signals for coordinating food intake and energy homeostasis.

At least two kinds of glucose sensor neurons have been described in the brain: glucose-excited neurons are located mainly in the VMH, and are excited by increased glucose levels in the extracellular space, while glucose-inhibited neurons (mainly present in the LH) are excited by decreases in glucose concentrations.

A direct relationship has been established between the regulation of food intake and energy homeostasis and hypothalamic metabolic sensor activities. In order to ensure a balanced cellular energy status, there are certain nutrient and energy sensors in key locations. The following are some examples of proteins that help to detect cellular energy and integrate nutrient and hormonal signals in order to maintain energy homeostasis in the organism: AMP-activated protein kinase (AMPK), the mammalian target of rapamycin (mTOR), and its downstream target p70 ribosomal protein S6 Kinase 1 (S6K1). Moreover, PAS kinase (PASK) has been characterized as a nutrient sensor in peripheral tissues.

AMPK activity is regulated by fluctuations in cellular energy produced by nutritional state or by metabolic stress reducing ATP production. The activation of AMPK occurs with a high AMP/ATP ratio in low energy states. Once activated,

the AMPK will help to restore the energy balance (Hardie et al., 1998; Rutter et al., 2003). By contrast, mTOR/S6K1 responds to an abundance of nutrients and hormones promoting anabolic processes and cell growth (Alessi et al., 2009; Foster and Fingar, 2010; Gingras et al., 2001; Proud, 2002; Zoncu et al., 2011). Both AMPK and mTOR respond to changes in glucose and other nutrients in a coordinated way and in opposite directions. On the other hand, initial studies have shown that PASK might be a nutrient sensor and regulator of glucose metabolism and cellular energy in peripheral tissues. Subsequent research has reported that PASK-deficient mice are resistant to diet-induced obesity, and it now seems that the role of PASK might therefore be similar to better known metabolic sensors, such as AMPK and mTOR, although prior to this thesis it has not been described in the hypothalamus.

Both metabolic sensors and anorexigenic and orexigenic peptides act in a coordinated way to finely control feeding behavior and energy metabolism. We have previously reported that glucagon-like peptide (GLP-1) is an anorexigenic peptide (Alvarez et al., 1996; Blazquez et al., 1998; Navarro et al., 1996; Rodriguez de Fonseca et al., 2000; Turton et al., 1996) that also reduces cerebral glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem (Alvarez et al., 2005). Additionally, GLP-1 leads to a reduction in food and water intake and, consequently, to weight loss. This peptide also has diverse biological activities affecting peripheral tissues besides the CNS. Thus, for example, GLP-1 stimulates pancreas insulin secretion in a glucose-dependent manner after eating; hence its denomination as an “incretin”. GLP-1 is secreted by L-intestinal cells after the intake of nutrients; however, its half-life is very short due to the actions of dipeptidyl peptidase IV. Accordingly, a longer half-life GLP-1 receptor agonist, exendin-4, is being used as an oral hypoglycemic agent in clinical practice (Niswender, 2010). In addition, exendin-4 administration in obese Zucker rats, which also develop insulin resistance, hyperinsulinemia and hyperlipidemia, reduces food intake and induces weight loss, as in lean rats. (Blonde et al., 2006; Buse et al., 2009; Montanya and Sesti, 2009; Rodriguez de Fonseca et al., 2000).

These GLP-1 actions in the pancreas and central nervous system are achieved through GLP-1 receptors (GLP-1R) that share the same gene sequence in both tissues. The first glucose sensor system described was in pancreatic β -cell, and consisted of glucokinase, glucose transporter 2 (GLUT-2) and GLP-1R. Subsequently, the co-expression of GLP-1R together with glucokinase and GLUT-2

in hypothalamic cells located in areas involved in feeding behavior might suggest the presence of a glucose sensor system in the brain similar to the one in the pancreatic β -cell (Alvarez et al., 2002; Navarro et al., 1996; Roncero et al., 2004; Roncero et al., 2000). In short, due to its action in the pancreas, GLP-1 is an antidiabetogenic agent, while its acting in hypothalamic areas, help to generate a state of satiety.

The increased prevalence of type 2 diabetes and obesity in recent years highlights the importance of developing therapies to integrate glycaemic control and food intake. Besides GLP-1, AMPK has been proposed as another possible target for hypoglycaemic drugs. We have therefore investigated the following: the role of PASK as a nutrient sensor in the hypothalamic areas involved in feeding behaviour, the effects of GLP-1/exendin-4 on the AMPK, PASK and mTOR/S6K1 pathways in the VMH and LH areas, and the importance of PASK deficiency in this network.

2 AIMS

The main aim of this thesis has been to investigate the role of PASK in the nutrient-sensing mechanism and the ability of GLP-1 or its analogue, exendin-4, to modulate the expression and activity of nutrient sensors (AMPK, mTOR/S6K1 and PASK) in the hypothalamic areas involved in feeding behavior (VMH and LH).

3 RESULTS

3.1 Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) reversal of AMP-activated protein kinase (AMPK) and S6 kinase (S6K1) activities induced by fluctuations in glucose levels

We studied the coordinated effects of glucose and GLP-1 on the expression and activity of AMPK and S6K1 in the VMH and LH - the hypothalamic areas involved in feeding behavior. Firstly, this approach was developed by *in vitro* assays using either hypothalamic slice explants or cell lines (GT1-7 and N2A), exposed to low- and high-glucose concentrations and incubated with GLP-1. The experimental approach was developed by quantitative real-time RT-PCR and by the quantification of active-phosphorylated protein levels by immunoblot.

Secondly, we used an *in vivo* system assay to investigate the response of AMPK and S6K1 in obese animals and the effects of exendin-4 on hypothalamic AMPK and S6K1 activation in lean control and male obese Zucker rats. The animals were killed 1 h after an exendin-4 injection was administered to rats fasted for 48 h or after re-feeding for 2–4 h.

3.1.1 Glucose and GLP-1 modulation of AMPK and S6K1 activities in hypothalamic GT1-7 and neuroblastoma N2A cell lines

Based on our results, the degree of AMPK phosphorylation at different glucose concentrations was significantly different when the cell lysates were and were not subjected to microwave irradiation. Our data suggested that the process used to make up the cell extracts was a definitive step in obtaining reproducible results. Exposure to microwave irradiation for 5–10 s immediately after the addition of a cell lysis buffer proved to be the most efficient method for maintaining the level of protein phosphorylation.

AMPK activities increased and S6K1 ones decreased at low- and high-glucose concentrations, respectively, and their activation occurred in a time-dependent manner, with AMPK (2 h) requiring less time than S6K1 (4 h). Under these conditions, GLP-1 treatment reversed the effects of glucose on the activation of AMPK and S6K1.

In order to study the mediators that might be involved in the signaling mechanism downstream from the GLP-1 receptor, and which could be mediating the regulation of hypothalamic metabolic sensors, several specific inhibitors of different protein kinases and phosphatases were used in N2A. The results show that both proteins phosphatases, PP1 and PP2B, and the protein kinases PKA, PKC and PI3K, may be mediating the GLP-1 actions on AMPK activity, whereas PI3K, mTOR and PKA mediated the high glucose and GLP-1 actions on S6K1 activity.

3.1.2 AMPK and mTOR/S6K1 pathway regulation in the ventromedial and lateral hypothalamus in response to nutritional states, modulated by anorexigenic peptide GLP-1/exendin-4 in lean and obese rats

Glucose and GLP-1 regulate AMPK expression in hypothalamic slice explants. Thus, high-glucose concentrations (10 mM) decreased the expression of

the mRNA coding AMPK α 2 in the LH area, and GLP-1 was able to recover the decreased expression of AMPK.

Additionally, AMPK activities increased and S6K1 decreased at low- and high-glucose concentrations, respectively, in both the VMH and the LH, and GLP-1 treatment reversed the glucose effects in both kinases, AMPK and S6K1.

Using an *in vivo* obesity model, we observed that food restriction activated AMPK in the VMH and LH areas in both lean control and obese Zucker rats. However, AMPK activity in both areas was lower in obese rats than in lean Zucker specimens. Re-feeding reduced AMPK activity in both areas. Exendin-4 regulates hypothalamic AMPK and S6K1 activities in lean control and obese Zucker rats. Thus, exendin-4 reversed the effect of fasting on AMPK activity in the lean controls, but was not able to do so in obese Zucker rats. We also analyzed S6K1 activity under the same conditions. Two hours of re-feeding reduced S6K1 activity in both areas, while 4 h later, S6K1 activity increased as compared to 2 h. The effect of exendin-4 administration in the fasted rats did not change S6K1 activity significantly; however, after 2 h re-feeding, exendin-4 treatment increased S6K1 activity in the VMH and LH in all the groups. Nevertheless, the effect of exendin-4 on S6K1 activity in the VMH differed between obese and lean rats. Thus, exendin-4 administration after 4 h of re-feeding, no significant effect was observed on S6K1 activity in the LH of the lean and obese rats, while exendin-4 reduced S6K1 activity in the VMH of the lean controls, but not of the obese Zucker rats.

In recent years, AMPK has been proposed as a cellular energy sensor for assembling many regulatory signals and nutritional environmental changes, and it is also involved in maintaining whole-body energy balance (Hardie et al., 2006). The regulation of the AMPK activity located in the hypothalamic areas involved in the control of feeding behavior has also been described as a mechanism for the detection of nutritional variations, including glucose levels (Mountjoy and Rutter, 2007). On the other hand, mTOR is one of the downstream targets of AMPK in which elevated glucose concentrations activate the mTOR/S6K1 pathways and inhibit food intake.

In this thesis, we confirm that the effects of glucose on AMPK and mTOR/S6K1 are region-specific in hypothalamic areas that have opposite effects over the control of feeding behavior. These effects were found both *in vitro*, using

hypothalamic slices, and *in vivo*, in lean and obese Zucker rats. We also show that certain features of GLP-1, which has been described as an anorexigenic and antidiabetogenic agent, may be mediated by regulating both hypothalamic nutrient sensors. Thus, we observed that AMPK and mTOR/S6K1 pathways respond to changes in glucose concentrations, and GLP-1 treatment reversed glucose effects.

It has already been reported that anorexigenic peptides decrease AMPK α 2 activity (Andersson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004), while other peptides, such as insulin and leptin, increase the phosphorylation of S6K1 (Cota et al., 2006). In our study, GLP-1 also modulated AMPK and mTOR/S6K1 activities in the VMH and LH, with a distinctive response in the LH as compared to the VMH. This result can be explained by the different roles these two areas play in the control of food intake, previously defined as centers of hunger and satiety, respectively.

3.2 PASK kinase as a nutrient sensor in N2A cells and in the hypothalamus. Furthermore, PASK is required for the normal expression and activity of other cellular nutrient and energy sensors

We studied the effect of glucose and GLP-1 on PASK expression and whether silencing PASK alters the glucose sensor mechanism. Accordingly, we investigated the presence of PASK in hypothalamic cells and areas involved in controlling food intake, such as the VMH and LH, the effect of PASK silencing on the expression of several genes, as well as the effect on the other nutrient sensors by analyzing the expression and activity of the AMPK and mTOR/S6K1 pathways.

We used two experimental models for this purpose: an *in vitro* approach using neuroblastoma N2A cell line or hypothalamic organotypic cultures. In order to study the function of PASK in nutrient sensing, we used siRNA to silence the PASK protein. Additionally, PASK-deficient mice were used to investigate *in vivo* the role of PASK in the hypothalamic areas involved in feeding behavior and their function in the nutrient sensor mechanism.

3.2.1 *PAS kinase as a nutrient and energy sensor in neuroblastoma cells and in hypothalamic areas (VMH and LH) and its modulation by GLP-1*

Through either *in situ* hybridization or X-gal staining, we found PASK-positive cells in both VMH and LH areas, besides other hypothalamic areas (i.e., arcuate, paraventricular and dorsomedial nuclei). Additionally, neuroblastoma N2A cells also expressed PASK.

Pask expression is dependent on glucose concentration in the extracellular medium. Thus, in hypothalamic organotypic cultures, higher glucose concentrations decreased by ~20 and 66 % the expression of the mRNA coding PASK in the VMH and LH, respectively. The presence of GLP-1 decreased *Pask* mRNA and partially reversed the effect of high glucose concentrations in the LH. Similar effects were observed in N2A cells. PASK-silenced cells recorded a 77 % decrease in PASK mRNA, and the expression of *Pask* did not respond to glucose or GLP-1.

3.2.2 *PAS kinase required for the normal expression of certain genes and for the response to glucose and GLP-1*

Pask knockdown in N2A cells induced an impaired response to glucose or to GLP-1 in the expression of certain genes. Thus, the expression of mRNA coding to liver kinase B1 (LKB1), one of the upstream kinases of AMPK, was altered in PASK knockdown cells. The expression of *Lkb1* was enhanced at a low glucose concentration, and the presence of GLP-1 reversed the glucose effect. However, the expression of mRNA coding to LKB1 decreased in PASK-silenced cells, and did not respond to glucose or GLP-1. Nevertheless, the effect of PASK deficiency on the expression of metabolic genes in mouse VMH and LH appears to be different. PASK-deficient mice had lower *Ampka2* mRNA levels in the VMH than wild-type mice, and a similar tendency was observed in the LH. By contrast, homeodomain-interacting protein kinase 2 (*Hipk2*) mRNA levels (a mediator of apoptotic pathways in neurons) were higher in the LH from PASK-deficient mice, and no significant differences were found in the expression of *Lkb1*. In agreement with the data observed in neuroblastoma cells, the effect of exendine-4 in the expression of genes was lost. Therefore, the absence of an exendine-4 effect in PASK-deficient mice explains the lower levels of LKB1, tuberous sclerosis 2 (TSC2), protein kinase B (PKB or Akt), mTOR, Eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1- α 1) and

neuronal nitric oxide synthase 1 (nNOS1) in the VMH from PASK-deficient mice, compared to their wild-type counterparts.

3.2.3 PAS kinase required for the normal nutrient sensing of AMPK and mTOR/S6K1 in neuroblastoma cells and in hypothalamic areas (VMH and LH)

As indicated above, AMPK activity in neuroblastoma cells increased at a low glucose concentration, while GLP-1 blocked this effect. However, neither glucose nor GLP-1 effects were observed in cells treated with siRNA targeting the *Pask* gene.

The presence of low glucose levels in PASK-silenced cells correlated with enhanced concentration of ATP and the low expression of mRNA coding to LKB1 and the absence of AMPK activation

Additionally, the level of total AMPK α 2 decreased in the presence of high glucose levels in control neuroblastoma cells, and the glucose effect was lost in PASK-silenced neuroblastoma cells. The activation of AMPK is associated with the enhanced phosphorylation of its downstream target, acetyl-CoA carboxylase (ACC). The level of ACC phosphorylation followed a similar pattern to AMPK in response to glucose and GLP-1, and *Pask* gene silencing once again blocked these responses.

Furthermore, the mTOR/S6K1 response was also disturbed. The activation of S6K1 was observed at a high glucose concentration, and GLP-1 significantly decreased S6K1 activation in neuroblastoma cells. However, PASK-silenced neuroblastoma cells recorded the complete loss of the ability of S6K1 to sense nutrient levels and respond to GLP-1.

In the case of PASK-deficient mice, the response both to nutrients under fasting or re-feeding conditions and to exendin-4 on metabolic sensors was also impaired in the VMH and LH.

Peak AMPK activity was observed only in the fasted state in the VMH and LH of wild-type mice. However, AMPK activity was also elevated in re-fed PASK-deficient mice. Increased AMPK activity after fasting was reversed by exendin-4

administration, specifically in the LH from wild-type mice, but this exendin-4 effect was lost in PASK-deficient mice.

By contrast, re-feeding increased S6K1 activity significantly in the LH, and similar results were observed in the VMH, although no significant differences were recorded. However, S6K1 activity was enhanced in both fasted and re-fed states in PASK-deficient mice. Exendin-4 increased S6K1 activity in fasted conditions, and decreased it when the wild-type mice were re-fed. However, the exendin-4 effect on S6K1 activity was lost in PASK-deficient mice.

Interestingly, the impairment was not hypothalamic-specific, as hepatic AMPK and S6K1 activation/inhibition were also altered in PASK-deficient mice.

3.2.4 PASK-deficient mice record altered feeding and blood glucose levels in response to subcutaneous exendin-4 treatment

It has been reported that exendin-4 has an anorexigenic effect on food intake, being also an antidiabetogenic agent, so we were interested to check whether PASK is required for that purpose. We therefore tested the feeding response after the subcutaneous administration of exendin-4 in PASK-deficient mice. The anorexigenic effect of exendin-4 was more potent for inhibiting food intake in wild-type mice than in their PASK-deficient counterparts, but only after 60 minutes of re-feeding. In parallel, blood glucose levels rose significantly after three hours of re-feeding in both wild-type and *Pask*^{-/-} mice compared to fasted animals, although glucose circulating levels in fasted and re-fed animals were similar in both types of mice. Exendin-4 treatment decreased the glucose levels in fasted and re-fed conditions, but once again this effect was lower in *Pask*^{-/-} mice. There is therefore a concordance between the lower decrease in blood glucose levels after exendin-4 treatment in the re-fed state and the loss of the anorexigenic power of exendin-4 in *Pask*^{-/-}. However, no changes were observed in the capacity of exendin-4 to modulate insulin levels in wild-type or *Pask*^{-/-} mice.

In recent years, besides AMPK and mTOR/S6K1 nutrient sensors, a description has been made of the existence of PASK, other comparable nutrient sensor. Although the PASK function has been described in pancreatic cells, the role of this kinase in hypothalamic nutrient sensing is unknown. The importance of PASK and its relationship with diseases such as obesity stems from the fact that

PASK-deficient mice are resistant to the development of obesity. Therefore, PASK could also be involved in obesity and type 2 diabetes, both directly and through its ability to alter the response of other nutrient sensors, such as AMPK and mTOR/S6K1. For example, it is generally accepted that both the AMPK and mTOR/S6K1 pathways have opposite cellular effects and respond to changes in glucose and other nutrients in opposite directions, and their effects on the regulation of food intake may overlap. However, our results show that AMPK and mTOR in PASK-deficient mice are both activated simultaneously in the areas involved in the control of food intake, suggesting that the PASK function could be critical for regulating the on/off activation of both pathways. Additionally, these PASK-deficient mice lose the effects that exendin-4/GLP-1 exerted in the activity of the AMPK and mTOR/S6K1 pathways, suggesting that PASK is one of the key kinases required for GLP-1 actions. Since GLP-1 is an anorexigenic peptide whose level increases after feeding, informing the central nervous system of nutrient status, it is reasonable to assume that PASK may be involved in the control of food intake. Interestingly, our data show that the anorexigenic effect of exendin-4 was reduced in PASK-deficient mice, in accordance with the significantly higher blood glucose levels found after exendin-4 treatment in PASK-deficient mice.

We postulate that the PASK function could be critical for the normal function of the sensors studied, and the deregulation of these signaling pathways might be involved in the development of obesity and type 2 diabetes. In this sense, a mutation in the PASK gene has been described in the early onset of diabetes (Semplici et al., 2011), and a decrease in PASK expression was also found in pancreatic islets from human type 2 diabetics (da Silva Xavier et al., 2011). These data seem to refute the resistance to the development of obesity previously described in PASK-deficient mice (Hao et al., 2007); however, the interpretation of the phenotypes in knockout mice is difficult due the redundancy of regulatory mechanisms. Our *in vitro* studies, where the compensatory mechanisms are limited, support *in vivo* data and reveal the role PASK plays as a nutrient sensor in neuroblastoma and hypothalamic cells, as well as its key role for sensing the nutrients of other metabolic sensors, such as the AMPK and mTOR/S6K1 pathways.

In short, the results reported here indicate that in the VMH and LH areas, GLP-1 modulates the activation status of AMPK and mTOR/S6K1 in response to

physiological variations in nutrients or those produced by pathological states such as obesity and insulin resistance. What's more, the data obtained suggest a potential role for GLP-1 or exendin-4 as preservers of the hypothalamic AMPK and mTOR/S6K1 activities in certain pathological states. Furthermore, we present experimental evidence to show that PASK is a nutrient sensor in the hypothalamic areas involved in feeding behavior, and that the PASK function is decisive for maintaining the nutrient and GLP-1 effect on the hypothalamic AMPK and mTOR/S6K1 pathways involved in feeding behavior and energy homeostasis.

4 CONCLUSIONS

GLP-1/exendin-4 modulates the activation state of AMPK and mTOR/S6K1 in the VMH and LH. This anorexigenic peptide reverses the activation/inhibition effect in response to physiological nutritional status and pathophysiological state, thus reinforcing the therapeutic potential of exendin-4 in pathophysiological conditions such as obesity and diabetes, while helping to strike a suitable balance in hypothalamic metabolic sensors activity by integrating nutrient and hormonal signals to maintain energy homeostasis.

PASK is a nutrient and hormonal sensor in rat VMH and LH, as well as in neuroblastoma cells, and PASK is also a key kinase in the actions of GLP-1. The knockdown of PASK alters the glucose sensing of other metabolic sensors, such as the AMPK and mTOR/S6K1 pathways. These metabolic sensors in the brain have been directly related to the regulation of food intake, bodyweight and energy homeostasis, suggesting that PASK might also play a role in feeding behavior.

Our data indicate that the PASK function may be critical for maintaining the mechanism of nutrient sensing on AMPK and mTOR/S6K1 in the hypothalamic areas involved in food intake, as well as for sustaining the regulatory role of exendin-4 in the control of that intake. Some of the anorexigenic or antidiabetogenic effects of exendin-4 may be modulated by PASK.

INTRODUCCIÓN

1 CONTROL DEL APETITO Y OBESIDAD

En la actualidad el aumento alarmante en la prevalencia del sobrepeso y la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas y representa una de las mayores amenazas para la salud, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo.

La obesidad se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa corporal producida por un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético, y supone un riesgo para desarrollar resistencia a la acción de la insulina, diabetes y otras enfermedades asociadas como la hipertensión, alteraciones inflamatorias, etc. (Lopaschuk et al., 2010).

Tanto la obesidad como otros desórdenes relacionados con la ingesta, tales como la anorexia o la bulimia, justifican la necesidad de desentrañar los procesos y mecanismos implicados en la regulación del apetito y del peso corporal, por lo que su estudio ha sido y sigue siendo de gran interés actualmente.

En los últimos años ha mejorado la comprensión de los mecanismos que controlan la homeostasis energética mediante la identificación de sofisticadas redes neuro-humorales que transmiten señales entre el cerebro y el tracto gastrointestinal con el fin de controlar la ingesta de alimentos.

1.1 Hambre, apetito y saciedad

Existen 3 categorías de factores que contribuyen a la expresión del apetito e interactúan durante el curso de un episodio de ingesta para formar una red bio-psicológica: experiencias psicológicas (sensaciones de hambre, saciedad, ansiedad...), señales fisiológicas periféricas y procesos neuronales centrales. El hambre es una expresión subjetiva de la voluntad o motivación para consumir alimentos, mientras que el apetito se puede definir como el proceso que conduce a la selección cualitativa y cuantitativa de alimentos específicos para la ingestión. La saciedad se refiere a los acontecimientos derivados del consumo de alimentos que sirven para suprimir el hambre o las ganas de comer inhibiendo la ingesta durante un determinado período de tiempo.

El control cerebral del apetito viene determinado por respuestas fisiológicas pre-prandiales (olfativas y visuales) que estimulan la ingesta de alimentos y preparan al cuerpo para la ingestión, mientras que las respuestas post-prandiales (post-ingestivas y post-absortivas) son señales de saciedad que conducen a la finalización de la ingesta. La contribución relativa de plenitud a la terminación de la ingesta depende del equilibrio entre estas respuestas. Durante e inmediatamente después de la ingesta, la información aferente de los alimentos en boca proporciona una retroalimentación positiva sobre la ingesta. Por el contrario, los mecano y quimio-receptores del estómago y del intestino delgado proporcionan principalmente una retroalimentación negativa (Harrold et al., 2012; Wadikar and Premavalli, 2012).

El mantenimiento del peso y la composición corporal dependen, por lo tanto, de una regulación central a través de regiones hipotalámicas y no hipotalámicas, así como de un control periférico a través del tracto gastrointestinal, tejido adiposo y páncreas, que incluye señales de saciedad y señales de adiposidad. La interrelación entre ambos sistemas está mediada por señales nerviosas, hormonas, neuropéptidos, nutrientes y metabolitos.

El tracto gastrointestinal y el sistema nervioso central (SNC) participan conjuntamente tanto en la regulación del apetito a corto y medio plazo como en el control del gasto energético y, por tanto, en la homeostasis energética y en la estabilidad de peso y composición corporal. Así, hormonas intestinales como el péptido YY (PYY), péptido semejante al glucagón 1 (GLP-1), polipéptido pancreático (PP), oxintomodulina (OXM) y grelina (Ghr) modulan la homeostasis energética a corto plazo. Sin embargo, la leptina y la insulina proporcionan señales de adiposidad y están implicadas en la regulación tanto a corto como a largo plazo de la homeostasis energética (Stanley et al., 2005; Suzuki et al., 2010).

1.2 Regulación del balance energético por el sistema nervioso central

La regulación del balance energético es altamente compleja y en ella están implicadas varias regiones del SNC, tales como la corteza cerebral, el hipotálamo y el tronco cerebral. Estos centros nerviosos poseen numerosos circuitos neuronales que conectan los centros del apetito y la saciedad produciendo señales sensoriales aferentes y eferentes (Fig. 1) (Badman and Flier, 2005).

El hipotálamo es la parte del SNC más estudiada e importante en relación con la regulación de la ingesta alimentaria, puesto que acoge la señalización y regulación de este proceso, en el que también están involucrados diferentes mediadores y regiones cerebrales (Leibowitz and Wortley, 2004). El papel del hipotálamo en la regulación de la ingesta de alimentos y del peso corporal se estableció en 1940 a través de los experimentos clásicos de Hetherington y Ranson, en los cuales las lesiones electrolíticas en determinadas regiones hipotalámicas producían un incremento de la adiposidad y de los niveles lipídicos y un aumento en el peso corporal (Hetherington and Ranson, 1942). Años más tarde se continuó con estos experimentos de forma más exhaustiva (Anand et al., 1964), demostrando que lesiones en el hipotálamo lateral (LH) causaban la pérdida de apetito, inanición e incluso la muerte por inanición, por lo que el área hipotalámica lateral actuaba como un "centro del hambre", mientras que lesiones en el hipotálamo ventromedial (VMH) incrementaban el apetito y la estimulación de dicha área lo disminuía, actuando como "centro de saciedad".

Desde entonces, se ha establecido que este "modelo dual hipotalámico" regula la ingesta de alimentos. Estudios posteriores han sugerido un papel de otros núcleos hipotalámicos, tales como el núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN) y núcleo hipotalámico dorsomedial (DMN) en la homeostasis energética. Además, trabajos actuales apuntan a que la ingesta de alimentos también está controlada por otras áreas del sistema nervioso central, tales como las áreas corticales y subcorticales.

Esta teoría del control dual de la alimentación tiene en consideración a la glucosa no sólo como combustible metabólico sino también como una molécula de señalización. En estas regiones hipotalámicas existen neuronas especializadas que contienen sensores de glucosa que activan o inhiben la ingesta dependiendo de sus niveles circulantes en sangre. Una caída en la concentración de glucosa activaría neuronas situadas en el área LH, se produciría la sensación de hambre conduciendo al consumo de alimentos y desencadenaría un incremento en los niveles de glucosa. Por el contrario, la hiperglucemia activaría neuronas del VMH dando lugar a una sensación de saciedad, e inhibiría la ingesta, lo que conllevaría finalmente a una disminución de los niveles de glucosa (Fig. 1).

Con el paso del tiempo, se están llegando a dilucidar los mecanismos moleculares de este proceso de regulación, definiendo exactamente qué

poblaciones neuronales responden a señales nutricionales específicas y cómo se transmite esa información.

Entre las regiones **hipotalámicas** relacionadas con el control de la ingesta caben destacar:

➤ El **ARC** se localiza cerca de la barrera hematoencefálica, por lo que las poblaciones neuronales que residen en dicha área son altamente accesibles a hormonas, las cuales atraviesan el epéndimo por difusión desde el fluido cerebroespinal al tercer ventrículo (Broadwell and Brightman, 1976). El ARC juega un papel importante en el control de la ingesta (Cone et al., 2001) debido a la presencia de neuronas que poseen receptores específicos para una gran variedad de señales. El ARC está implicado en la integración de señales periféricas de saciedad y de adiposidad mediante la transmisión de neuropéptidos orexigénicos (estimulan la ingesta) y anorexigénicos (inhiben la ingesta) a otras regiones hipotalámicas y extra-hipotalámicas del cerebro (Schwartz et al., 2000).

En esta región existen dos poblaciones neuronales clave con efectos opuestos en la ingesta (Lopaschuk et al., 2010; Stanley et al., 2005; Suzuki et al., 2012) (Fig. 1):

- Una que expresa péptidos orexigénicos: el neuropéptido Y (NPY) y la denominada proteína relacionada con agouti (AgRP).
- Una segunda población que expresa péptidos anorexigénicos: la α -melanotropina (α -MSH), derivado de la pro-opiomelanocortina (POMC) y transcritos regulados por cocaína y anfetaminas (CART).

Estas dos poblaciones tienen receptores para hormonas como la leptina, insulina y péptidos gastrointestinales. Desde el ARC se proyectan fibras nerviosas a otras regiones importantes como el PVN, hipotálamo dorsomedial (DMH), LH y VMH donde se expresan otros neuropéptidos involucrados en la regulación del balance energético (Leibowitz and Wortley, 2004). Además, el ARC recibe información aferente vía núcleo del tracto solitario (NTS)/área postrema (AP). A su vez, todas estas regiones se encuentran interconectadas bajo distintas vías neuronales controlando así el apetito y la ingesta.

➤ Como se ha mencionado con anterioridad, las áreas hipotalámicas **VMH** y **LH** son consideradas como el centro de la saciedad y del hambre respectivamente

y juegan un papel fundamental en la regulación de la ingesta. La estimulación del área VMH inhibe el apetito, debido a la presencia de gran cantidad de neuronas que expresan receptores de péptidos anorexigénicos como son la leptina y la colecistoquinina (CCK) (Williams et al., 2000). El VMH también es rico en neuronas respondedoras de glucosa y recibe proyecciones de las poblaciones neuronales de NPY/AgRP y POMC/CART procedentes del ARC. En este caso, las neuronas se activan cuando los niveles de glucosa en sangre son altos y, como consecuencia, responden disminuyendo la ingesta. La activación de receptores de leptina en esta área promueve la inhibición de la ingesta estimulando el gasto energético y produciendo disminución del peso corporal (Stanley et al., 2005).

El área LH está vagamente delimitada, recibe proyecciones del ARC y en ella se localizan neuronas que expresan orexinas, hormona concentradora de melanina (MCH), así como neuronas sensibles a glucosa (NSG), que son estimuladas cuando desciende la concentración de glucosa y, por tanto, producen un incremento de la ingesta (Peyron et al., 1998; Qu et al., 1996; Suzuki et al., 2012) (Fig. 1).

➤ El **PVN**, situado en la parte superior del tercer ventrículo en el hipotálamo anterior, es un centro integrador donde convergen gran cantidad de rutas neuronales que están involucradas en la homeostasis energética (Broberger, 2005). Esta región recibe proyecciones de las poblaciones neuronales de NPY/AgRP y POMC/CART del ARC y neuronas de orexina y MCH del LH (Harrold et al., 2012; Suzuki et al., 2012) (Fig. 1).

➤ Otra área de interés en el control del balance energético es el **DMH**, localizado dorsalmente al VMH. Interviene en la regulación de la ingesta porque contiene elevados niveles de NPY/AgRP y α -MSH procedentes del ARC y del PVN respectivamente. Lesiones en el DMH producen hiperfagia y, por tanto, obesidad (Suzuki et al., 2012) (Fig. 1).

➤ Por otra parte, el control del apetito y del peso corporal también está regulado por el **tronco cerebral** y la **médula espinal**, encargadas de recoger la información aferente proveniente del nervio vago (que es la principal conexión neuro-anatómica entre el tracto gastrointestinal y el cerebro). El **nervio vago** acoge terminaciones nerviosas provenientes de quimio y mecano-receptores sensibles a cualquier señal gastrointestinal producida por la distensión, la presencia de

nutrientes o metabolitos y la síntesis de péptidos en células endocrinas de la pared del estómago e intestino, informando sobre el estado nutricional del individuo (Broberger, 2005; Woods, 2004). La distensión gástrica no es la única señal necesaria para producir saciedad postprandial, puesto que las neuronas aferentes vagales expresan gran variedad de receptores incluyendo los de CCK, leptina, NPY, GLP-1 y péptido similar al glucagón 2 (GLP-2), así como receptores de grelina y de orexina. La señalización de los receptores de la leptina y la insulina y los mecanismos de detección de glucosa en el tronco cerebral son similares a los observados en el hipotálamo (Suzuki et al., 2010) (Fig. 1).

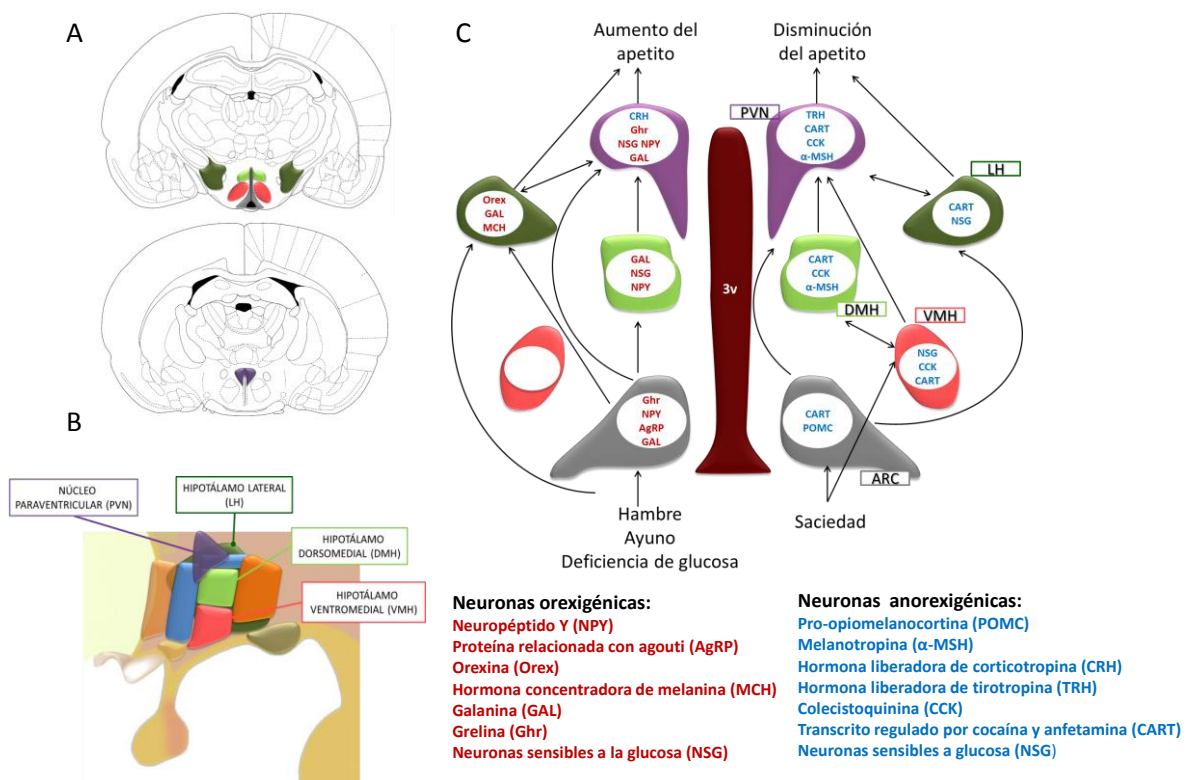


Figura 1. A y B. Esquemas representativos de la localización de las áreas hipotalámicas en una vista transversal (A) y sagital (B). C. Esquema representativo de la regulación de la ingesta y peso corporal mediado por el hipotálamo. Adaptado de (Holmes et al., 2001) y (Martinez and Solomon, 2006).

➤ A través del nervio vago se transmiten señales de saciedad desde el tracto gastrointestinal al NTS, localizado en el tronco cerebral. Este núcleo recibe extensas proyecciones neuronales del PVN y viceversa, lo que indica que existe una comunicación recíproca entre el hipotálamo y el tronco cerebral (Ter Horst et al., 1989; van der Kooy et al., 1984). Además, presenta una elevada densidad de

neuronas con sitios de unión al NPY (Dumont et al., 1998; Glass et al., 2002) y productoras de POMC (Suzuki et al., 2010).

En definitiva, todas estas áreas hipotalámicas y extra-hipotalámicas sintetizan péptidos que producen diversas señales que, a través de conexiones neuronales, regulan la ingesta y la homeostasis energética (Broberger, 2005).

Al menos se han encontrado 25 neuropéptidos que desempeñan un papel clave en el comportamiento alimentario (Kalra et al., 1999). Entre ellos, existen neuropéptidos encargados de estimular la ingesta (péptidos orexigénicos) o de inhibirla (péptidos anorexigénicos).

1.2.1 *Neuropéptidos orexigénicos secretados por el hipotálamo*

Entre los neuropéptidos orexigénicos liberados por el hipotálamo caben destacar entre otros (Arora and Anubhuti, 2006; Harrold et al., 2012; Parker and Bloom, 2012; Wadikar and Premavalli, 2012) (Fig.1):

— ***Neuropéptido Y (NPY)***. Péptido de 36 aminoácidos que se expresa mayoritariamente en el ARC. Es uno de los neuropéptidos más abundantes en el cerebro y se considera una de las moléculas orexigénicas más potentes que se conocen. Este péptido actúa a través de diferentes receptores acoplados a proteínas G (Y1, Y2, Y4, Y5, Y6) disminuyendo la actividad de la adenilato ciclasa y, por lo tanto, reduciendo los niveles de AMPc e incrementando la concentración de calcio intracelular. La administración central de NPY incrementa la ingesta de alimentos.

— ***Proteína relacionada con agouti (AgRP)***. Péptido de 132 aminoácidos que se expresa solamente en el ARC y es co-secretado junto con NPY en respuesta al ayuno. La expresión de AgRP es inhibida por la leptina. La administración crónica de AgRP en roedores se ha visto que causa hiperfagia y obesidad.

— ***Hormona concentradora de melanina (MCH)***. Péptido de 19 aminoácidos que se expresa principalmente en el LH. En humanos hay dos receptores acoplados a proteínas G: MCHR-1 y 2 que unen MCH, mientras que en roedores sólo ha sido identificado el 1. Los receptores MCHR-1 se expresan en todo el cerebro y también en tejidos periféricos, como el tejido adiposo y el intestino. La administración de esta hormona en el LH incrementa la ingesta.

— **Orexina A y B.** Descritas inicialmente como hipocretinas, son péptidos de 33 y 28 aminoácidos respectivamente. Estos neuropéptidos actúan a través de dos receptores: OX₁R, que se expresa mayoritariamente en el ARC y LH, y OX₂R que se expresa mayoritariamente en el PVN. Algunos estudios evidencian que la orexina A incrementa la ingesta debido a un retraso en la sensación de saciedad.

Otros neuropéptidos orexigénicos son los **opioides**, la **galanina** (GAL) y los **endocannabinoides**, que están implicados en el control del balance energético y en la regulación del peso corporal produciendo un incremento de la ingesta de alimentos.

1.2.2 Neuropéptidos anorexigénicos secretados por el hipotálamo

Los neuropéptidos anorexigénicos son aquellos péptidos liberados por el hipotálamo que inhiben la ingesta (Arora and Anubhuti, 2006; Harrold et al., 2012; Parker and Bloom, 2012) (Fig.1). Algunos de los más estudiados se describen a continuación:

— **Melanocortinas (MC).** El polipéptido POMC es el precursor de la familia de la melanocortina, que incluye a la adrenocorticotropina (ACTH), y las α , β y γ melanotropinas, también denominadas hormonas estimulantes de los melanocitos (MSH). De los 5 subtipos de receptores identificados, los expresados en cerebro son MC3-R y MC4-R, pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G. La estimulación de las neuronas POMC conlleva a la secreción de varios péptidos de esta familia promoviendo un incremento del gasto energético y la disminución de la ingesta. Los niveles de estos péptidos son bajos durante el ayuno y se incrementan después de la ingestión de alimentos.

— **Transcritos regulados por cocaína y anfetaminas (CART).** Al igual que otros neuropéptidos hipotalámicos, la expresión de CART responde al estado nutricional. Así, el ayuno disminuye la expresión de este neuropéptido y la ingesta de dieta rica en grasas la aumenta. Se encuentra localizado en áreas específicas, tales como el PVN, DMH, LH y ARC. Hay evidencias que establecen que las vías de CART y la leptina están vinculadas. Diferentes estudios indican que la administración intracerebroventricular (icv) de CART provoca una reducción en la ingesta.

Otros neuropéptidos anorexigénicos son el GLP-1 y GLP-2. La descripción de las funciones en el control de la ingesta del GLP-1 se detallará en una sección posterior de este trabajo.

Algunos estudios evidencian que la neurotensina (NT) también puede modular el comportamiento alimentario.

Muchos de los péptidos que regulan la ingesta en el cerebro están también localizados en las células enteroendocrinas de la mucosa del tracto gastrointestinal, en el sistema nervioso entérico (ENS) y en las fibras nerviosas aferentes vagales. Así, la orexina A y receptores de orexina se encuentran en neuronas localizadas en los plexos submucoso y mientérico del tracto gastrointestinal y en células endocrinas de la mucosa intestinal y de los islotes pancreáticos (Kirchgessner and Liu, 1999; Naslund et al., 2002).

1.3 Regulación de la ingesta por tejidos periféricos

Las hormonas liberadas por el aparato digestivo (tracto gastrointestinal y páncreas) y el tejido adiposo, desempeñan un papel importante en la regulación de la ingesta de alimentos y el gasto energético. Estas hormonas y péptidos proporcionan mecanismos de retroalimentación que permiten mantener el peso corporal estable a pesar de las variaciones diarias de gasto energético y de la ingesta de nutrientes.

Uno de los sistemas periféricos que informa de manera relevante al SNC sobre la situación nutricional del individuo es el **tracto gastrointestinal**, que genera señales de hambre o de saciedad. El aparato digestivo transforma y degrada los alimentos mediante procesos mecánicos y químicos para facilitar la asimilación de los nutrientes contenidos en ellos (Konturek et al., 2003). Dichos procesos desencadenan señales que conducen a la estimulación y secreción de distintas hormonas y péptidos que informan al sistema nervioso central de la situación nutritiva y metabólica (Stanley et al., 2005) (Fig. 2).

Entre los péptidos gastrointestinales implicados en la regulación del apetito y del peso corporal caben destacar, entre otros, aquellos que inducen señales de hambre y de inicio de la ingesta, como la grelina, y los que producen señales de saciedad como el péptido YY (PYY), GLP-1, CCK, oxintomodulina (OXM), etc. (Harrold et al., 2012; Lopaschuk et al., 2010; Perry and Wang, 2012; Sam et al., 2012;

Suzuki et al., 2012; Wadikar and Premavalli, 2012). El lugar de expresión, así como las características y funciones más importantes de estos péptidos gastrointestinales se encuentran resumidos en la Tabla 1.

PÉPTIDOS	LUGAR EXPRESIÓN	TIPO	CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN
Grelina (Ghr)	Células X/A de las glándulas oxínticas gástricas e intestino, páncreas y colon	Orexigénico	Actúa como un ligando endógeno de receptores del secretagogo de la hormona de crecimiento (GHS-R). Existen receptores de grelina en el ARC y PVN, donde median una acción orexigénica estimulando las neuronas NPY/AgRP del ARC. Incrementa la ingesta y peso corporal
Péptido YY (PYY)	Células L intestinales	Anorexigénico	Liberado en respuesta a la ingesta de nutrientes. Actúa a través de los receptores Y2R suprimiendo la liberación de NPY inducida por el hambre en el ARC
Péptido semejante al glucagón 1 (GLP-1)	Células L intestinales	Anorexigénico	Liberado en respuesta a la ingesta. Actúa a través del receptor de GLP-1 (GLP-1R), que se expresa en cerebro, tracto gastrointestinal y páncreas. Disminuye la ingesta y además tiene efectos a nivel periférico *Más detalles en el apartado 4
Colecistoquinina (CCK)	Células I intestinales	Anorexigénico	Actúa a través de los receptores CCK-1R y CCK-2R que se encuentran distribuidos en el cerebro, incluyendo el tronco cerebral y el hipotálamo. Disminuye la ingesta y estimula la liberación de enzimas del páncreas y de la vesícula biliar, promoviendo la motilidad intestinal y el retraso del vaciamiento gástrico
Oxintomodulina (OXM)	Células L del tracto gastrointestinal distal	Anorexigénico	Secretado junto con el GLP-1 y PYY en respuesta a la ingesta de alimentos de manera proporcional a la ingesta calórica. Es un péptido anorexigénico, que también muestra una actividad incretina. Sus efectos podrían estar mediados por GLP-1R, o por otros receptores no identificados
Bombesina y péptidos semejantes a la bombesina: Neuromedina B y Péptido relacionado con la gastrina	Tracto gastrointestinal	Anorexigénicos	Los receptores para los péptidos semejantes a la bombesina se encuentran tanto en el SNC como en el tracto gastrointestinal y pueden participar en el control de la ingesta. Sus acciones en el SNC contribuyen a la regulación del comportamiento alimentario, del metabolismo y de la termorregulación. La administración central de bombesina y de sus péptidos relacionados suprime la ingesta
Somatostatina (SS)	SNC y SNP, estómago, tracto gastrointestinal, páncreas, SNA y células neuroendocrinas	Anorexigénico	Regula la glucemia, inhibe la secreción de insulina y glucagón, e induce señales de saciedad

Tabla 1. Relación de péptidos gastrointestinales implicados en la regulación del apetito y del peso corporal. Núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN), neuropéptido Y (NPY), proteína relacionada con agouti (AgRP), sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso periférico (SNP), sistema nervioso autónomo (SNA).

En cuanto a las hormonas derivadas del **páncreas** que regulan la ingesta de alimentos destacan la insulina, la amilina y el polipéptido pancreático (PP). Además, el **tejido adiposo** constituye una importante fuente de hormonas (como la leptina, adiponectina y resistina) que controlan la homeostasis energética hipotalámica (Harrold et al., 2012; Lopaschuk et al., 2010; Perry and Wang, 2012; Suzuki et al., 2012; Suzuki et al., 2010; Yu and Kim, 2012). El conjunto de hormonas derivadas del páncreas y del tejido adiposo que están implicadas en la regulación de la ingesta se encuentran resumidas en la Tabla 2.

	PÉPTIDOS	LUGAR EXPRESIÓN	TIPO	CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN
HORMONAS PANCREÁTICAS	Insulina	Células β -pancreáticas	Anorexigénico	Actúa en el SNC disminuyendo el apetito y la ingesta de alimentos. La expresión de receptores de insulina es elevada en el cerebro, particularmente en áreas hipotalámicas involucradas en la regulación de la ingesta como el ARC, DMH y PVN. Disminuye la expresión de los neuropéptidos NPY y AgRP y aumenta la de POMC en el ARC. Además regula la actividad de la enzima sensora de glucosa, glucoquinasa, en hipotálamo
	Polipéptido pancreático (PP)	Células de los islotes pancreáticos	Anorexigénico	Actúa a través del receptor Y4, que se expresa en el tronco cerebral e hipotálamo. Produce una disminución del apetito e inhibe la ingesta. El PP tiene otros efectos fisiológicos, como la inhibición de la contracción de la vesícula biliar, la secreción exocrina pancreática y el vaciamiento gástrico
	Glucagón	Células α -pancreáticas	Anorexigénico	Promueve la glucogenolisis y la gluconeogénesis hepática para mantener el equilibrio glucémico en respuesta a ayuno y ejercicio. Actúa a través de un receptor acoplado a proteínas G, que está ampliamente distribuido en los tejidos, aunque predominantemente se encuentra en hígado y riñón. Disminuye la ingesta y produce retraso en el vaciamiento gástrico.
	Amilina	Células β -pancreáticas	Anorexigénico	Co-secretado junto con la insulina. Actúa a través del receptor AMY1-3. La administración de amilina promueve la reducción de la ingesta y peso corporal. La acción anorexigénica de la amilina parece estar relacionada con la serotonina, histamina y sistema dopaminérgico en el cerebro, así como con la inhibición de la liberación del NPY

(Continúa)

	PÉPTIDOS	LUGAR EXPRESIÓN	TIPO	CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN
HORMONAS DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO	Leptina	Tejido adiposo blanco	Anorexigénico	Los niveles circulantes son proporcionales a la cantidad de grasa. Ejerce su efecto anorexigénico en el ARC, donde inhibe las neuronas NPY/AgRP y activa a las POMC/CART, resultando en una disminución de la ingesta y un incremento en el gasto energético
	Adiponectina	Tejido adiposo blanco	Anorexigénico	Existen dos receptores de la adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) en las neuronas hipotalámicas NPY y POMC del ARC, aunque se desconoce si es capaz de sobrepasar la barrera hematoencefálica. Previene el desarrollo de la obesidad inducida por la dieta
	Resistina	Tejido adiposo blanco y neuronas POMC hipotalámicas, entre otros tejidos	Anorexigénico	Produce efectos que parecen depender del estado de alimentación/ayuno. Se ha postulado que podría actuar de forma paracrina participando en la regulación de la homeostasis energética

Tabla 2. Relación de hormonas pancreáticas y hormonas derivadas del tejido adiposo implicadas en la regulación del apetito y del peso corporal. Sistema nervioso central (SNC), núcleo arqueado (ARC), hipotálamo dorsomedial (DMH), núcleo paraventricular (PVN), neuropéptido Y (NPY), proteína relacionada con agouti (AgRP), pro-opiomelanocortina (POMC), transcritos regulados por cocaína y anfetaminas (CART).

En resumen, la situación nutricional y metabólica en que se encuentra el organismo son las desencadenantes de las señales nerviosas, endocrinas y metabólicas producidas por los distintos órganos y sistemas que regulan la homeostasis energética. La integración de este conglomerado de estímulos contribuye al mantenimiento estable del peso y la composición corporal a través de la regulación del balance energético (ingesta y gasto), en el que interactúa el tracto gastrointestinal, el tejido adiposo, el páncreas y el sistema nervioso central mediante señales nerviosas específicas (Fig. 2).



2 SISTEMAS SENSORES DE GLUCOSA EN EL CONTROL DE LA INGESTA. DIFERENCIAS ENTRE EL VMH Y LH

2.1 Sistemas sensores de glucosa

La glucosa es utilizada por las células fundamentalmente como un sustrato energético, pero también como una molécula de señalización implicada en procesos de gran importancia funcional.

Las concentraciones circulantes de glucosa se mantienen dentro de un rango fisiológico dependiendo del estado nutricional del individuo, de los efectos antagonistas de las hormonas pancreáticas insulina y glucagón, de las actividades del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal y de los componentes del sistema nervioso autónomo. Las alteraciones de los valores normoglucémicos tienen consecuencias deletéreas que aumentan la morbilidad y mortalidad de la población. Con objeto de evitar oscilaciones marcadas de la glucemia, existen sistemas sensores de glucosa que actúan en el intestino, las células pancreáticas endocrinas, la vena porta, sistema nervioso central y algunas células neuroendocrinas. Estos sensores permiten generar los mecanismos necesarios para mantener la homeostasis de la glucosa (Sanz et al., 2011).

Los sensores de glucosa son diseños moleculares que determinan con precisión las concentraciones de glucosa en el espacio extracelular. La primera indicación sobre la existencia de un sistema sensor de glucosa fue descrita en las células β -pancreáticas (Matschinsky, 1990). Este sistema está constituido por la isoforma 2 del transportador de glucosa (GLUT-2) y por la glucoquinasa (GK). Estas proteínas tienen una alta K_m (baja afinidad) para transportar o fosforilar la glucosa respectivamente, lo que permite que intervengan cuando aumenta la glucemia después de las comidas (Sanz et al., 2011).

La GK cataliza la fosforilación de la glucosa con baja afinidad y no es inhibida por su producto (glucosa-6-fosfato), lo que da lugar a una mayor utilización de la glucosa a medida que aumenta su concentración. Debido a las propiedades de la GK, el grado de catabolismo de la glucosa es proporcional a los niveles de glucosa en el espacio extracelular, y por esa razón la GK es el principal contribuyente a la sensibilidad de la glucosa, ya que cataliza la etapa limitante del

metabolismo de la glucosa actuando como un auténtico sensor de glucosa (Sanz et al., 2011).

La actividad del **GLUT-2** juega un papel notable en el catabolismo de la glucosa, pero no es determinante como sensor de glucosa, ya que el transporte de glucosa en las células β -pancreáticas es 100 veces más alto que el grado de metabolización de la hexosa (Sanz et al., 2011).

La GK controla la oxidación de la glucosa y la formación de ATP y, como consecuencia de ello, incrementa el cociente ATP/ADP que facilita el cierre de los canales de potasio y la despolarización de las células β -pancreáticas. Todo ello promueve la apertura de los canales de calcio dependientes del aumento del calcio intracelular, responsable de la exocitosis de los gránulos de secreción de insulina. Las señales del metabolismo de la glucosa actúan de manera sinérgica con las señales generadas por la vía del AMPc. Esta vía puede ser activada por GLP-1 y por el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) para facilitar la liberación de insulina (Sanz et al., 2011). Estos dos péptidos (denominados incretinas) son liberados por las células intestinales tras la ingesta y promueven la secreción de insulina disminuyendo los niveles de glucosa en sangre.

Otro sistema sensor de glucosa está localizado en la vena porta, cercano al hilio hepático y conectado, a través de las ramas hepáticas aferentes del nervio vago, a neuronas sensoras presentes en el LH y NTS (Burcelin and Thorens, 2001). Este **sensor de glucosa hepatoportal** está constituido por el transportador GLUT-2 y los receptores de GLP-1 y somatostatina, y requiere un gradiente de concentración de glucosa positivo para ser activado y así poder controlar varias funciones: estimulación del transporte de glucosa hepática, descarga del nervio vago e incremento de la utilización de glucosa por el músculo esquelético.

Además, la GK está presente en las células L y K intestinales, productoras de GLP-1 y GIP respectivamente. En ellas puede jugar un papel sensor de glucosa facilitando la secreción de ambos péptidos en respuesta a la ingesta de alimentos y asegurando de esta forma la actividad incretina de ambas moléculas dentro del eje entero-insular. Asimismo, en la mucosa intestinal se han caracterizado sensores de glucosa que utilizan la GK como el auténtico detector de las concentraciones de la hexosa.

2.2 Sensores de glucosa en el cerebro

Debido a que el cerebro depende de un suministro constante de glucosa para alimentar sus demandas metabólicas, posee neuronas glucosensibles especializadas en supervisar y responder a la disponibilidad de nutrientes. Estas neuronas usan los productos del metabolismo intracelular de glucosa para regular su actividad y liberar neurotransmisores. La glucosa sufre un transporte facilitado a través de la barrera hematoencefálica y, por tanto, los niveles de glucosa extracelular en el cerebro se equilibran rápidamente con los niveles en sangre, pero varían considerablemente entre las áreas del cerebro (Silver and Erecinska, 1994). En general, las neuronas glucosensibles del cerebro están localizadas en aquellas áreas involucradas en el control de las funciones neuroendocrinas, el metabolismo de nutrientes y la homeostasis energética.

El cerebro y específicamente el hipotálamo, detecta y responde tanto a los cambios en los niveles de glucosa en la sangre, como a los péptidos y hormonas circulantes que reflejan el estado de energía. Por tanto, el hipotálamo puede actuar como un verdadero sensor de glucosa en el desempeño de sus funciones del control de la ingesta y la homeostasis energética (Shiraishi, 1991). De hecho, los primeros sensores de glucosa cerebrales fueron descubiertos en los llamados "centro de la saciedad" y "centro del hambre" localizados en el núcleo VMH y LH respectivamente (Levin et al., 2004).

Estas regiones del cerebro, además de otras, pueden ser alteradas por señales metabólicas. Así, se observan cambios en la actividad eléctrica de las neuronas mediante la aplicación directa de glucosa o por alteraciones en las concentraciones circulantes de glucosa (Ashford et al., 1990; Silver and Erecinska, 1994; Song et al., 2001), que actuaría principalmente como molécula excitadora en ciertas neuronas del VMH e inhibidora en las del LH y NTS (Mizuno and Oomura, 1984).

Se conocen algunas de las moléculas componentes de los sistemas sensores de glucosa hipotalámicos. Así, por ejemplo, los ARN mensajeros que codifican para GLUT-2, GK y el receptor de GLP-1 se co-expresan en áreas implicadas en la regulación de la homeostasis energética, ingesta de alimentos y metabolismo de la glucosa (Alvarez et al., 2005; Alvarez et al., 1996; Blazquez et al., 1998; Navarro et al., 1996; Rodríguez de Fonseca et al., 2000; Roncero et al., 2004). La co-localización

de estas moléculas podría sugerir que intervienen en un sistema sensor de glucosa necesario para el establecimiento de un estado de saciedad. De esta forma, el aumento de la glucemia después de las comidas puede ser detectado en las neuronas hipotalámicas gracias a las altas K_m del transportador de glucosa GLUT-2 y a la actividad fosforilante de la GK. Además, la puesta en marcha de estos componentes aumenta la producción de ATP celular durante la oxidación de la glucosa, lo que podría facilitar la transducción de señales necesarias para producir un estado de saciedad.

Se han descrito al menos dos tipos de neuronas sensoras de glucosa (Levin et al., 1999; Oomura et al., 1969; Oomura and Yoshimatsu, 1984; Song et al., 2001):

— *Neuronas estimuladas por incremento en los niveles de glucosa (GE)* (Jewell and Guan, 2013; Jordan et al., 2010; Mountjoy and Rutter, 2007) (Fig. 3), presentes principalmente en el VMH, si bien también pueden encontrarse en los núcleos ARC y PVN. Aunque existe controversia al respecto, se ha propuesto que estas neuronas se corresponden, al menos en parte, con poblaciones neuronales que expresan el neuropéptido POMC. También se ha observado que neuronas que expresan MCH en el LH son estimuladas por incremento en la concentración de glucosa, sugiriendo que podrían formar una subpoblación de neuronas GE residentes en el LH.

Estas neuronas GE, excitadas por el aumento de glucosa en el espacio extracelular, tienen una conducta electrofisiológica similar a la observada en las células β -pancreáticas. De hecho, los componentes responsables de la detección de glucosa en las neuronas GE parecen ser los mismos que están presentes en las células β -pancreáticas: GLUT-2 y GK, e igualmente utilizarían los canales de potasio sensibles a ATP (K^+ -ATP). Sin embargo, si bien los canales K^+ -ATP se expresan en todas las neuronas GE, sólo aproximadamente la mitad de éstas expresan la GK en el VMH, y sobre un 30% expresan el transportador de glucosa GLUT-2. Es más, aunque algunas neuronas glucosensitivas y no glucosensitivas expresan GLUT-2 y GLUT-4, la mayoría usan el transportador de glucosa de alta afinidad GLUT-3 como transportador principal.

Se ha demostrado que los ratones transgénicos que carecen de la subunidad $\alpha 2$ de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) (un importante indicador del combustible celular) también carecen de neuronas GE. Otros autores indican

que pueden existir otras estrategias alternativas para la detección de glucosa en distintos subtipos de neuronas GE.

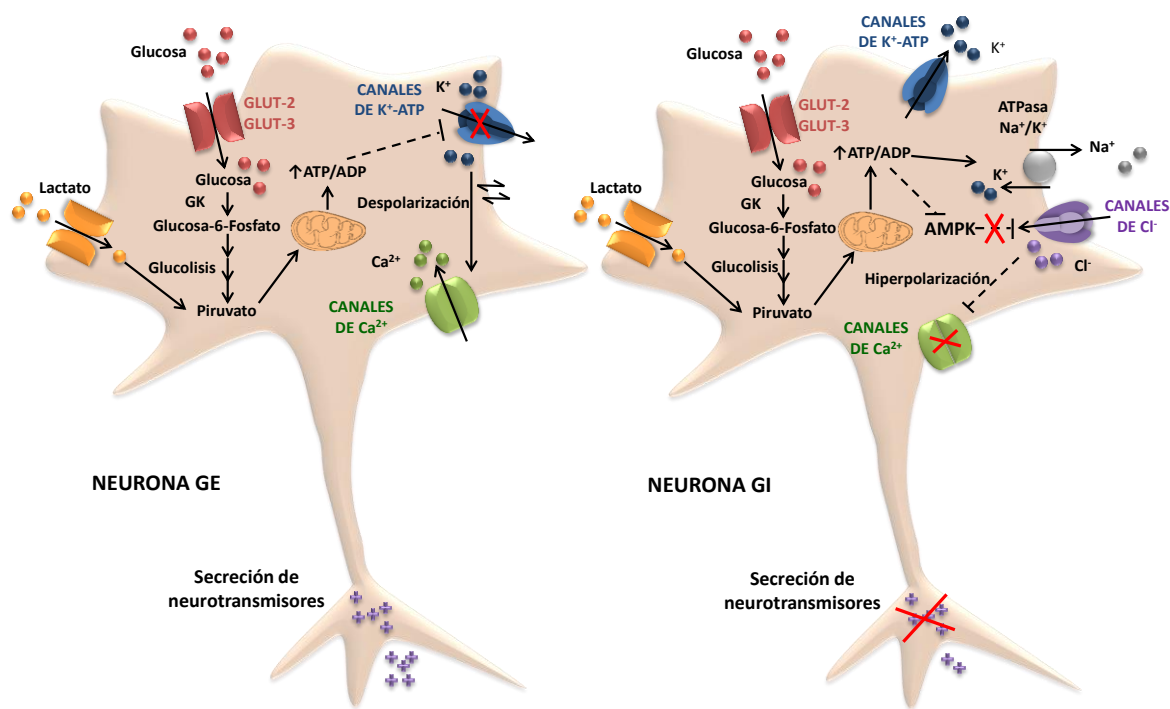


Figura 3. Esquema representativo de los mecanismos de activación de neuronas hipotálamicas GE y GI en respuesta a alteraciones en los niveles de glucosa.

— *Neuronas inhibidas por el incremento en los niveles de glucosa (GI)* (Jewell and Guan, 2013; Jordan et al., 2010; Mountjoy and Rutter, 2007) (Fig. 3), localizadas fundamentalmente en el LH, aunque también se encuentran en los núcleos ARC y PVN. Determinados estudios indican que las neuronas GI expresan neuropéptidos orexigénicos como NPY y, al igual que las neuronas mientéricas o las células α -pancreáticas, son excitadas por la disminución de las concentraciones de glucosa en el espacio extracelular.

Las neuronas GI tienen componentes similares a las GE, tales como la GK, GLUT-2, GLUT-3 y GLUT-4. Inicialmente se postuló que la inhibición de estas células a elevados niveles de glucosa podría estar regulada por un incremento en el ratio ATP/ADP, lo que incrementaría la actividad ATPasa Na^+ - K^+ . Más recientemente también se ha observado que los cambios en la actividad de la AMPK α 2 podrían mediar la activación de las neuronas GI situadas en el VMH.

Como es sabido, la activación farmacológica de la AMPK hipotalámica aumenta la ingesta de alimentos. Por ello, no es sorprendente que la disminución de la glucosa en estas neuronas active a la AMPK, tal y como lo hace en otros tejidos, donde esta quinasa se encuentra presente (véase apartado 3.2.3). Es posible que un descenso en la concentración de glucosa, y la consecuente activación de esta quinasa, produzca en las neuronas GI la fosforilación e inactivación de canales de Cl^- u otros canales iónicos, conduciendo a la despolarización y activación de estas neuronas. Estudios de Murphy y cols. sugieren que en las neuronas GI del VMH la activación de la AMPK fosforila a la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) produciendo un aumento del óxido nítrico (NO), que a su vez amplifica la activación de la AMPK (Murphy et al., 2009).

En otras neuronas GI la hiperpolarización inducida por la glucosa podría ser debida a la apertura de los canales de K^+ por un mecanismo independiente de ATP y AMPK.

Es importante tener en cuenta que la concentración cerebral de glucosa intersticial es aproximadamente un 30% de las concentraciones encontradas en la sangre. Por lo tanto, cuando la concentración plasmática de glucosa periférica es 7,6 mM, la glucosa intersticial en el VMH es sólo 2,5 mM. Situaciones de hipoglucemia o hiperglucemia, cuyos niveles de glucosa en sangre serían de 2-3 mM y 15 mM respectivamente, darán lugar a niveles de glucosa en el cerebro de 0,16 mM y 4,5 mM. Ello indica que las concentraciones de glucosa existentes dentro de la mayoría de las regiones cerebrales *in vivo* estarían dentro del rango de 0,2 a 5 mM.

Para la mayoría de las neuronas glucosensibles del cerebro, el regulador primario parece ser la GK, que está presente tanto en las neuronas GE como en las GI (en menor medida) (Dunn-Meynell et al., 1998). Sin embargo, el papel de los transportadores de glucosa tales como el GLUT-2, GLUT-3, el transportador insulino-dependiente (GLUT-4) o el transportador sodio-glucosa (SGLT) no parecen tener un papel predominante en la respuesta de las neuronas GE y GI a las alteraciones de los niveles de glucosa (Levin et al., 2004). GLUT-3 es un transportador ubicuo neuronal que se encuentra completamente saturado a prácticamente cualquier concentración de glucosa cerebral, por lo que es poco probable que sea un factor determinante en la función sensora de glucosa. En el caso del GLUT-2, a pesar de que se expresa hasta en un tercio de neuronas

sensibles a glucosa, un número equivalente de neuronas no glucosensibles también expresan dicho transportador. Por otra parte, aunque un alto porcentaje de neuronas GE y GI co-expresan el receptor de la insulina y el GLUT-4, la activación de estas neuronas se produce por alteraciones en los niveles de glucosa en ausencia de insulina. Y por último, el SGLT-1 es expresado sólo en un mínimo porcentaje de neuronas GE y GI, aunque las neuronas GE parecen ser sensibles a un inhibidor de este transportador (Kang et al., 2004; Song et al., 2001; Wang et al., 2004). A pesar de esto, la capacidad glucosensitiva podría venir mediada por transportadores de glucosa GLUT-2, GLUT-4 o SGLT en aquellas neuronas que no expresan la GK.

Existen otras regiones cerebrales no hipotalámicas donde están presentes neuronas GE y GI como, por ejemplo, las áreas: AP, NTS y el núcleo motor dorsal del vago del tronco cerebral (Marty et al., 2007). Tanto el NTS como la amígdala actúan como sensores, (Mizuno and Oomura, 1984; Nakano et al., 1986) y las neuronas detectoras de glucosa localizadas en estas áreas supervisan el estado energético e inician las respuestas que permiten el mantenimiento de los niveles de glucosa y la homeostasis energética.

Además de los sensores de glucosa en el cerebro, también hay sensores de glucosa localizados en los tejidos periféricos, incluyendo el intestino (Raybould, 2007), el cuerpo carotideo (Koyama et al., 2000) y venas mesentéricas (Matveyenko and Donovan, 2006).

3 OTROS SENSORES METABÓLICOS: AMPK, mTOR/S6K Y PASK

El mantenimiento de la homeostasis energética es indispensable para la supervivencia de los organismos, por lo que es necesaria la presencia de sensores de nutrientes y energéticos que permitan ajustar el flujo a través de las correspondientes rutas metabólicas. Muchos de estos sensores y rutas de señalización están conservadas desde las levaduras hasta los mamíferos, lo que demuestra lo extremadamente útiles que son.

Entre los sensores metabólicos más importantes se han identificado 2 proteínas quinasas que responden a cambios en la disponibilidad de nutrientes endógenos en las células de mamíferos (Lindsley and Rutter, 2004; Rutter et al., 2003). Una de ellas es la AMPK, que es activada por un elevado cociente

AMP/ATP. La otra proteína es una quinasa con dominios PAS (Per-Arnt-Sim) (PASK), que actúa como sensor de parámetros del entorno intracelular como la luz, oxígeno, estado redox y ATP (Hofer et al., 2001; Rutter et al., 2001). Otro sensor metabólico es el complejo mTOR (siglas de su nombre en inglés *Mammalian Target Of Rapamycin*), con actividad serina/treonina quinasa que forma parte de la vía mTOR/S6K. Este complejo, al contrario que la AMPK, se activa en condiciones de elevado cociente ATP/AMP, fundamentalmente por la presencia de niveles elevados de aminoácidos o factores de crecimiento.

3.1 Vía mTOR/S6K. Regulación y función

La vía mTOR/S6K integra una serie de rutas de señalización que son iniciadas por nutrientes (por ejemplo, aminoácidos), factores de crecimiento y señales hormonales. Su principal protagonista es mTOR, que básicamente es un complejo sensor de nutrientes, oxígeno y niveles energéticos celulares. La activación de mTOR promueve las vías anabólicas e inhibe las catabólicas. De hecho, la importancia de esta vía de señalización se pone de manifiesto porque su mal funcionamiento origina enfermedades humanas tales como la diabetes, obesidad, depresión y algunos tipos de cáncer. Los resultados hasta ahora indican que el complejo TORC1 de mamíferos (mTORC1) controla procesos celulares fundamentales, incluyendo la transcripción, la síntesis de proteínas y de lípidos, además del tamaño, crecimiento y metabolismo celular. Es por ello que mTOR constituye una diana terapéutica de interés (Jewell and Guan, 2013).

Básicamente mTOR es la subunidad catalítica con actividad quinasa (Ser/Thr quinasa) de dos complejos moleculares, denominados mTORC1 y mTORC2. Estos poseen diferentes subunidades, regulación, sustratos selectivos y sensibilidad a la rapamicina, por lo que son funcionalmente distintos:

- **mTORC1** muestra sensibilidad a la rapamicina, gracias a la presencia de la proteína adaptadora sensible a la rapamicina (RAPTOR, acrónimo de *Regulatory-Associated Protein of mTOR*). mTORC1 regula el crecimiento celular. Este complejo responde a factores de crecimiento, insulina, nutrientes, energía y estado redox promoviendo la síntesis de proteínas y las vías anabólicas, y suprimiendo las catabólicas, como la autofagia.

- **mTORC2** es insensible a la rapamicina, gracias a la presencia de la subunidad RICTOR (*Rapamycin-Insensitive Companion Of mTOR*). Este complejo promueve la proliferación y supervivencia celular y también regula el citoesqueleto de actina.

Es de destacar que, aunque ambos complejos responden a factores de crecimiento, sólo mTORC1 está controlado por nutrientes como glucosa y aminoácidos.

El complejo mTORC1 fosforila varios sustratos, entre los cuales destacamos la familia de proteínas quinasas de la proteína ribosomal S6 (S6K1 y S6K2), cuyo primer sustrato identificado fue la proteína ribosómica S6 (rpS6), un componente de la subunidad ribosomal 40S. Las S6K poseen importantes funciones, aunque no completamente definidas en la fisiología celular y del organismo. Dado que uno de los efectores (y diana de fosforilación directa) de mTOR es la S6K1, los niveles de fosforilación de ésta han sido utilizados como medida de la actividad de mTOR.

Aunque la comprensión acerca del funcionamiento de la vía de señalización mTORC1-S6K1 en la fisiología es aún incipiente, las evidencias indican que esta vía de señalización participa en el control de procesos fisiológicos muy diversos como la homeostasis de la glucosa, la sensibilidad a la insulina, el metabolismo de los adipocitos, el balance energético y la masa corporal, el tamaño de órganos y tejidos, el aprendizaje, la memoria y el envejecimiento. Además, la desregulación de este eje de señalización contribuye a diversos estados patológicos (Jewell and Guan, 2013; Zoncu et al., 2011).

3.1.1 Sustratos celulares y funciones de la vía de señalización mTOR/S6K1

Los factores de crecimiento pueden activar la vía mTOR/S6K a través de la ruta de señalización de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (Akt). De una manera independiente de la ruta PI3K, la vía Ras/MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) también activa a mTORC1. Ambas vías cooperan con otras señales para la activación de mTORC1 y las S6Ks (Ip and Wong, 2012; Jewell and Guan, 2013; Magnuson et al., 2012; Zoncu et al., 2011).

- La **vía de señalización PI3K/Akt** comienza con la estimulación de receptores acoplados a proteínas G (o receptores con actividad tirosina quinasa), que reclutan a la PI3K hacia la membrana plasmática. En concreto, los residuos de

tirosina fosforilados de estos receptores interaccionan con la subunidad reguladora de PI3K. La proteína PI3K entonces fosforila fosfatidilinositoles 4,5 bisfosfato (PIP₂) dando lugar a fosfatidilinositoles 3,4,5 trifosfato (PIP₃). Los PIP₃ reclutan y activan a la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) y a Akt, que es activada por fosforilación en dos lugares diferentes. Así, el complejo mTORC2 fosforila a la Akt en un residuo de serina y PDK1 lo hace en un residuo de treonina. Además PDK1 participa en la activación de la proteína S6K (Fig. 4).

La regulación de mTOR por Akt ocurre a través de la asociación/disociación del complejo de la esclerosis tuberosa (TSC) formado por TSC1 y 2. TSC1 estabiliza a TSC2, que actúa como una proteína activadora de la GTPasa (GAP) promoviendo la hidrólisis de GTP de Rheb (proteína homóloga de Ras enriquecida en cerebro) y, por lo tanto, inactivándola. Una vez activada Akt, ésta fosforila a TSC2 interrumpiendo el complejo. Cuando el complejo está interrumpido, Rheb-GDP (inactivo) pasa al estado Rheb-GTP (activo), que finalmente estimula a mTORC1.

La proteína fosfatasa PTEN (fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato 3 fosfatasa) actúa como un regulador de la ruta de señalización de la PI3K, ya que antagoniza esta vía de señalización defosforilando fosfoinosítidos. La activación de esta vía tiene como resultado neto el incremento en la supervivencia celular, proliferación, crecimiento y metabolismo (Jewell and Guan, 2013; Magnuson et al., 2012) (Fig. 4).

➤ Los mitógenos activan la **cascada Ras/MAPK**, activando a mTORC1. ERK (quinasa regulada por señales extracelulares) fosforila a TSC2, inhibiendo el complejo TSC1/TSC2 e induciendo la actividad de mTORC1. RAPTOR es además fosforilado por ERK (Jewell and Guan, 2013; Magnuson et al., 2012) (Fig. 4).

➤ mTORC1 es también estimulado por aminoácidos, especialmente la leucina. Esta vía de activación es independiente de PI3K. La regulación de mTOR por los aminoácidos necesita **Rag GTPasas** y Rheb. Los detalles del mecanismo de activación son desconocidos. Parece ser que las Rag GTPasas interactúan físicamente con RAPTOR y reclutan a mTORC1 a la membrana lisosomal promoviendo su activación por Rheb. (Jewell and Guan, 2013; Magnuson et al., 2012) (Fig. 4).

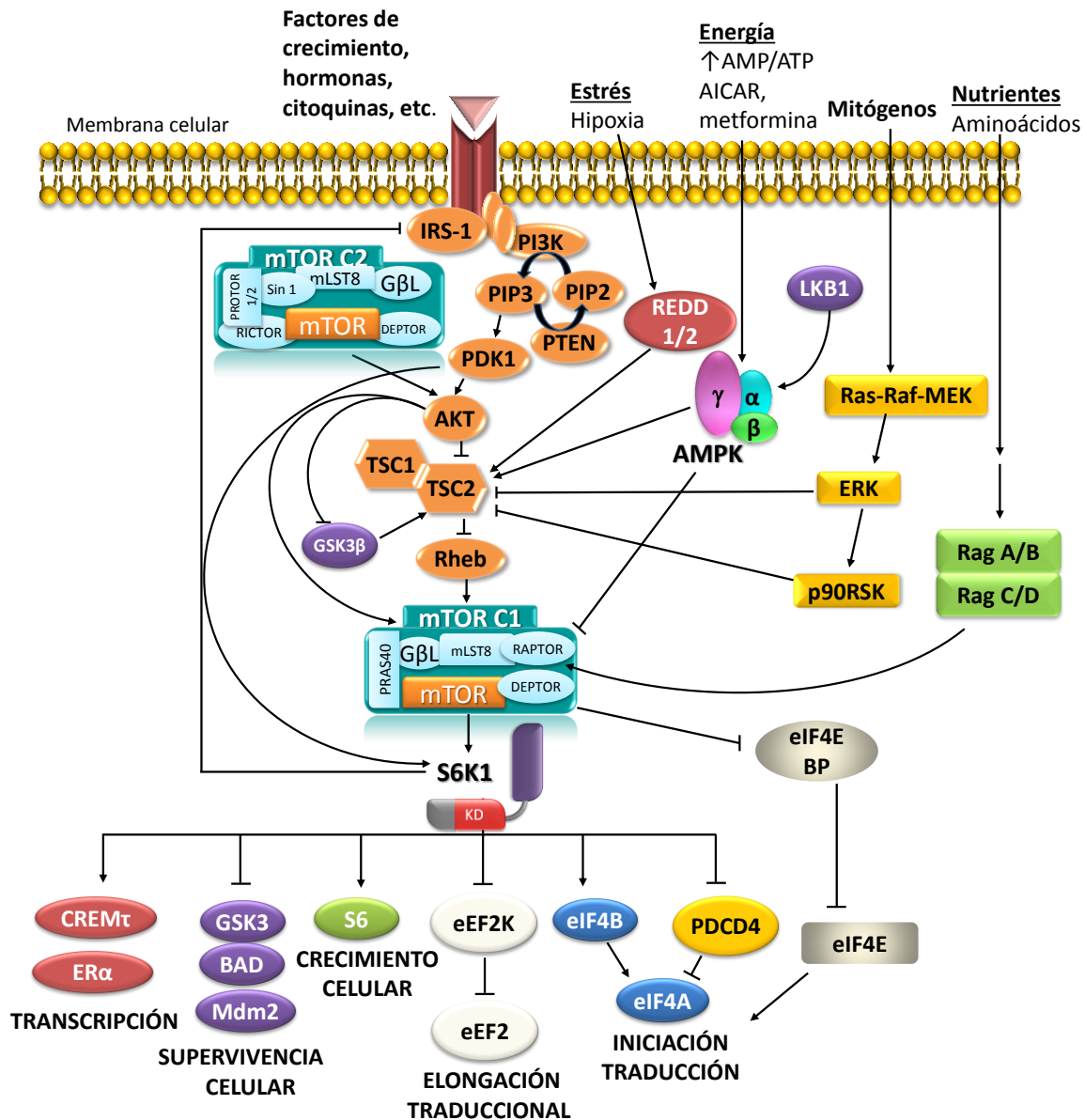


Figura 4. Esquema representativo de las proteínas involucradas en la vía de señalización mTOR/S6K1.

➤ mTORC1 es inhibido en condiciones de depleción energética en coordinación con la actividad de la **AMPK**. Un incremento en AMP/ATP activa AMPK, la cual fosforila a TSC2, y esta modificación induce la inhibición concomitante de mTORC1 mediada por TSC1/TSC2. Además, la AMPK fosforila RAPTOR, lo que inhibe este complejo. La depleción energética inhibe también a mTORC1 por un mecanismo que es independiente de la activación de AMPK. AMPK se inhibe, asimismo, por la fosforilación de S6K1 (Jewell and Guan, 2013; Magnuson et al., 2012; Xu et al., 2012) (Fig. 4).

➤ Los daños en el ADN también producen la inhibición del complejo mTORC1 a través de un incremento en la activación de AMPK y de **REDD1** (acrónimo de *REgulated in Development and DNA damage responses*) dependiente de p53 (Jewell and Guan, 2013) (Fig.4).

➤ La glucógeno sintasa quinasa 3 β (**GSK3 β**), que es regulada por la vía de señalización Wnt, fosforila a TSC2 y regula mTOR. La fosforilación de TSC2 por AMPK actúa como un cebador para la fosforilación y activación de TSC2 por la GSK3 β . La vía de señalización de Wnt promueve la activación de mTOR y el crecimiento celular a través de la inhibición por fosforilación de la GSK3 β .

La activación de la vía mTOR promueve procesos anabólicos fosforilando múltiples sustratos, dos de los más importantes son las proteínas de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (eIF4E-BPs) y las ya mencionadas S6Ks.

A través de sus sustratos identificados y otros mecanismos poco claros, S6K1 promueve varios procesos celulares generales como son la síntesis de proteínas, el crecimiento, tamaño y supervivencia celular, la transcripción de genes, la diferenciación de adipocitos, la plasticidad sináptica y la remodelación del citoesqueleto de actina.

3.1.2 S6K. Estructura y regulación celular

La activación de S6K1 ocurre de forma coordinada mediante la fosforilación por mTORC1 y PDK1. Los factores de crecimiento, mitógenos, aminoácidos y estados energéticos favorables activan el eje mTORC1/S6K1 promoviendo los procesos anabólicos, mientras que estados de depleción energética y estrés celular como hipoxia suprimen esta vía (Fig. 4).

En mamíferos, las proteínas S6Ks son miembros de una familia de proteínas codificadas a partir de dos genes diferentes: *S6K1* (*RPS6KB1*, también conocido como *S6Ka*), y *S6K2* (*RPS6KB2*, también conocido como *S6K β*) (Magnuson et al., 2012).

El producto del gen *S6K1* más ampliamente estudiado es la isoforma de 70 kDa (también conocida como p70-S6K1) (Fig. 5). En adelante nos referiremos a la p70-S6K1 como S6K1, una de la quinasas de interés en nuestro estudio.

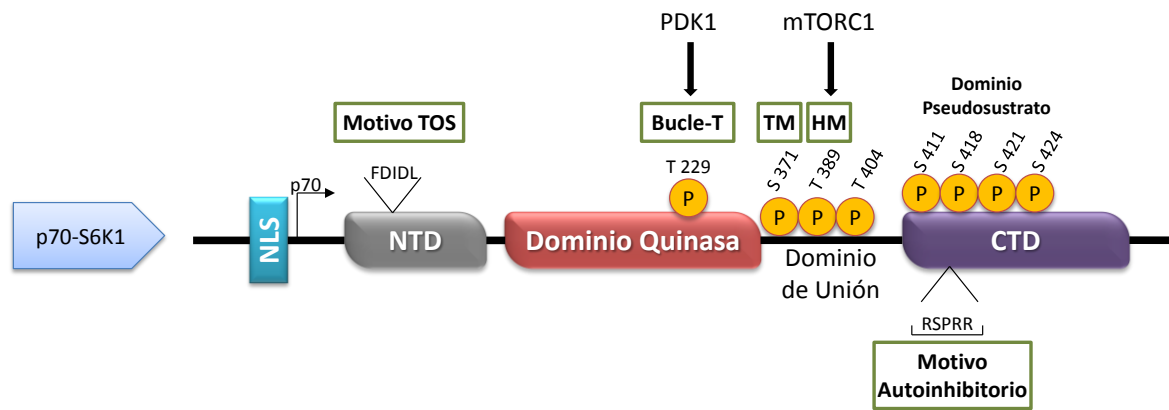


Figura 5. Modelo ilustrativo de los dominios y sitios de fosforilación de la S6K. La S6K puede ser dividida en 5 dominios funcionales: el dominio N-terminal (NTD), que presenta el motivo TOS (gris), dominio quinasa (KD) (rojo), el dominio de unión, el dominio pseudosustrato que presenta un motivo autoinhibitorio y el dominio C-terminal básico (CTD) (morado). Adaptado de (Magnuson et al., 2012).

La proteína S6K1 presenta varios dominios importantes: un dominio amino N-terminal (NTD) ácido, que contiene el motivo TOS; el dominio quinasa (KD), que contiene el bucle T; una región de engarce o unión que contiene dos importantes sitios de fosforilación: HM (*hydrophobic motif*) y TM (*turn motif*); un dominio de pseudo-sustrato, que contiene un motivo auto-inhibitorio, y el dominio C-terminal básico (CTD). El sitio TM fosforilado estabiliza la unión del sitio HM. Se han localizado, al menos, ocho residuos diana para la fosforilación en la S6K1 (Ip and Wong, 2012; Magnuson et al., 2012) (Fig. 6).

Hay dos modelos que explican la activación de S6K1 por fosforilación en múltiples sitios (Fig. 6).

— *Modelo 1 o modelo convencional:*

La interacción de los dominios N- y C-terminal conllevaría a la autoinhibición de S6K1. Los mitógenos promoverían la fosforilación en múltiples sitios del dominio C-terminal induciendo una conformación más relajada. La liberación del dominio C-terminal autoinhibitorio permitiría el acceso de mTORC1 al sitio HM, que fosforilaría en la Thr 389, posibilitando que PDK1 fosforile la Thr 229 del bucle T, resultando en la completa activación de S6K1.

— *Modelo 2 o modelo alternativo:*

Una quinasa desconocida fosforilaría la forma inactiva de S6K1 del sitio TM en la Ser 371. Los mitógenos promoverían la fosforilación del dominio C-terminal en múltiples sitios induciendo una conformación más relajada. La liberación del dominio C-terminal autoinhibitorio permitiría el acceso de PDK1 al bucle T fosforilando en la Thr 229. Esta promovería, a su vez, la fosforilación mediada por mTORC1 en el sitio HM, resultando en la completa activación de S6K1 (Ip and Wong, 2012; Magnuson et al., 2012).

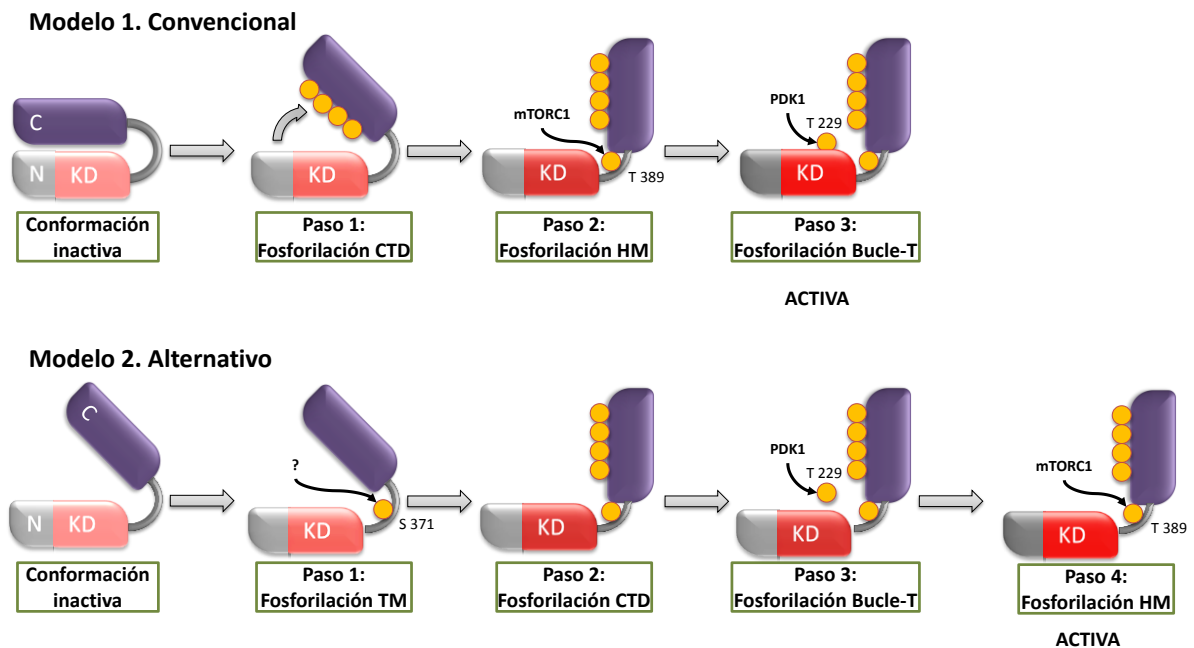


Figura 6. Esquema representativo de los modelos de activación de la S6K1. Adaptado de (Magnuson et al., 2012).

Aunque la fosforilación representa el mecanismo más comprendido de la regulación de la S6K1, se han propuesto diferentes modificaciones post-traduccionales que pueden regular esta quinasa, incluyendo la defosforilación mediada por fosfatasas, acetilación, ubiquitinación y regulación de la localización subcelular (Magnuson et al., 2012). La activación de S6K1 promueve la retroalimentación negativa sobre la señalización de PI3K, fosforilando e inhibiendo al sustrato del receptor de insulina (IRS-1) (suprimiendo la sensibilidad a insulina/IGF).

- S6K1 regula la **síntesis de proteínas** de varias maneras (Ip and Wong, 2012) (Fig. 4):

- Mediante el procesamiento de un subconjunto de ARN mensajeros, de los que la mayoría de ellos codifican para proteínas ribosomales, factores de elongación y proteínas esenciales para la traducción.
- En la etapa de iniciación de la síntesis proteica, la vía mTOR/S6K1 regula tanto factores de iniciación de la traducción como proteínas de unión de algunos de estos factores. La activación de mTORC1 promueve la iniciación de la síntesis de proteínas por la fosforilación de las proteínas eIF4E-BPs que liberan al factor de iniciación 4E (eIF-4E). Además, la S6K1 regula la iniciación por fosforilación del eIF-4B, que conduce a que el factor eIF-4A se una al complejo de iniciación de la traducción.
- Por otra parte, S6K1 puede regular la etapa de elongación de la síntesis proteica mediante la inhibición de la quinasa del factor de elongación eucariótico 2 (eEF-2K), un regulador negativo del factor de elongación eucariótico 2 (eEF-2).

- Además, S6K1 pueden regular el **crecimiento y tamaño celular** a través de la rpS6 (proteína S6 de la subunidad ribosómica 40S), que está involucrada en el control traduccional, en el crecimiento y progresión del ciclo celular, y puede facilitar el plegamiento de las proteínas a través de la chaperonina citosólica eucariota CCT β (Ip and Wong, 2012) (Fig.4).

La función de S6K1 en el crecimiento y tamaño celular se ha estudiado en *Drosophila* y en ratones. Montagne y cols. demostraron que la pérdida del gen *S6k1* es semi-lethal en *Drosophila* y que los pocos adultos supervivientes tenían una reducción severa en el tamaño corporal, debido a una disminución en el tamaño celular en lugar de una reducción en el número de células. Sin embargo, la deficiencia del gen de S6K1 no es letal en ratones, a pesar de que su tamaño corporal al nacer era reducido debido a una disminución de peso de los órganos (incluyendo los testículos). El crecimiento celular modulado por S6K1 puede ser independiente de la proteína S6, debido a que el nivel de fosforilación de S6 permanece intacto en los ratones deficientes para S6K1 (Montagne et al., 1999).

- Por otro lado se han descrito evidencias acerca del papel de S6K1 en la **progresión del ciclo celular** (Ip and Wong, 2012) (Fig. 4).

- S6K1 participa en la **supervivencia celular**, a través de BAD, Mdm2, GSK3 y, posiblemente, a través RICTOR del complejo mTORC2. El promotor de muerte celular asociado a Bcl-2 (BAD), una proteína pro-apoptótica, es un efector de S6K1 que regula la supervivencia celular. La S6K1 puede rescatar a las células de la apoptosis, fosforilando e inhibiendo a BAD y también pueden promover la supervivencia celular, a través de la fosforilación de Mdm2, una ubiquitina ligasa de la proteína p53, denominada también como “el guardián del genoma” (Ip and Wong, 2012) (Fig. 4).

- Además de las funciones mencionadas anteriormente, S6K1 puede regular factores de transcripción como el modulador de los elementos de respuesta a AMPc (CREM τ) y los receptores de estrógenos alfa (ER α). S6K1 también regula el citoesqueleto de actina jugando un papel importante en la migración celular, a través de proteínas G pequeñas de la familia Rho (Cdc 42, Rac1) (Ip and Wong, 2012) (Fig. 4).

3.1.3 *La vía de señalización mTOR/S6K1 en el control de la ingesta*

mTORC1 es un sensor metabólico que juega un papel importante en la regulación hipotalámica del comportamiento alimentario y del peso corporal (Cota et al., 2006; Ropelle et al., 2008). mTOR y su diana, S6K1, están ampliamente distribuidos en el cerebro de rata. Las formas activadas de mTOR y S6K1 se localizan principalmente en los núcleos PVN y ARC, siendo co-localizados en un alto porcentaje de las neuronas que expresan neuropéptidos orexigénicos AgRP/NPY y también en torno a la mitad de las neuronas anorexigénicas que expresan POMC/CART en el ARC (Cota et al., 2006).

Experimentos llevados a cabo en ratas por Cota y cols., indican que las señales anorexigénicas como la leucina, leptina y la re-alimentación incrementan la actividad hipotalámica de mTOR, con la consecuente disminución de ingesta de alimentos. Sin embargo, la rapamicina inhibe la vía mTOR en el hipotálamo, impidiendo la señalización de mTOR /S6K mediada por leucina y bloqueando, por tanto, la supresión de la ingesta (Cota et al., 2008; Cota et al., 2006). Además, se ha

propuesto que la grelina también promueve la ingesta a través de la modulación de la vía mTOR hipotalámica (Martins et al., 2012).

Ratones deficientes en S6K1 (*S6k1*^{-/-}) muestran resistencia a la obesidad inducida por la dieta o la edad, revelando un papel de la vía mTOR/S6K1 en el control del balance energético y del peso corporal. La modulación de la actividad S6K1, en áreas específicas del hipotálamo medio basal del cerebro de rata, sugiere un papel para esta quinasa en el control central de la ingesta y en las respuestas metabólicas que mantienen el equilibrio energético. Por otro lado, la vía mTORC1/S6K1 y la consecuente activación de S6K1 por señales como la leptina, parece ser importante en la modulación del balance energético que conduce hacia fenotipos delgados. La regulación y función de esta vía de señalización es probablemente única en cada tipo neuronal. Así, la estimulación de la vía mTOR por inactivación de TSC1 en neuronas POMC produce un incremento de la ingesta y del peso corporal, lo que contradice los resultados descritos anteriormente. Se requiere, por ello, un estudio más exhaustivo para entender el control del balance energético por la vía mTOR/S6K1 (Magnuson et al., 2012).

3.1.4 La vía de señalización mTOR/S6K1 en condiciones patológicas

Hay abundantes pruebas que otorgan un papel importante a mTORC1 en innumerables patologías, como la diabetes, la obesidad, el cáncer y síndromes tumorales benignos, hipertrofia de órganos, trastornos neurológicos (por ejemplo, los trastornos del espectro autista y enfermedad de Alzheimer) y patologías relacionadas con la edad. Estas respuestas patológicas probablemente derivan de efectos celulares de mTORC1 sobre la síntesis de proteínas y de lípidos, el crecimiento celular y la proliferación y metabolismo celular. Sin embargo, la comprensión acerca de los efectores de mTORC1 que median estas respuestas celulares y fisiológicas es incipiente (Magnuson et al., 2012).

La delección del gen de S6K1 da lugar a importantes alteraciones fisiológicas. Los ratones *S6k1*^{-/-}, además de tener menor tamaño corporal y órganos más pequeños, presentan hipoinsulinemia e intolerancia a la glucosa como resultado de la insuficiente producción de insulina por parte de las células β -pancreáticas. Esto se traduce, por lo menos en parte, en una reducción en el tamaño de este tipo de células. Determinados estudios demuestran que la estimulación de la vía de

señalización de mTORC1/S6K1 contribuye a la resistencia a la insulina *in vivo* (Magnuson et al., 2012).

El eje mTORC1/S6K1 también controla el metabolismo de los adipocitos. Los ratones *S6k1^{-/-}* poseen un menor número de adipocitos, debido a la disminución de la diferenciación de células madre hacia precursores adipogénicos. Además, estos ratones almacenan menos grasa que los de tipo silvestre, debido: i) al aumento de la lipólisis de triglicéridos, a la mejora de la biogénesis mitocondrial y la β -oxidación de los ácidos grasos y ii) a la elevada actividad de la AMPK, que se traduce en un incremento de la tasa metabólica (indicado por el aumento de consumo de O_2). Del mismo modo, la inhibición de mTORC1 en los adipocitos cultivados conlleva una inhibición de la lipogénesis y, por ello, un reducido almacenamiento de grasas. Estos fenotipos son consistentes con el papel anabólico general de mTORC1 en el metabolismo (Magnuson et al., 2012).

La vía mTOR se encuentra activada en procesos cancerígenos, particularmente por estimulación de la vía de señalización de PI3K, o por inactivación mutagénica de PTEN, por lo que esta vía ha sido considerada una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer. Además de la hipertrofia de órganos, recientes estudios sugieren un papel de mTOR en procesos de aprendizaje y memoria, así como en la longevidad y patologías relacionadas con la edad (Magnuson et al., 2012).

3.2 Vía AMPK. Regulación y función

La AMPK percibe la disponibilidad energética celular detectando la proporción de AMP/ATP. Esta quinasa se activa en estados de baja disponibilidad energética, promoviendo las vías catabólicas generadoras de ATP e inhibiendo las vías anabólicas.

3.2.1 AMPK. Estructura y regulación celular

La AMPK es un complejo heterotrimérico que consta de una subunidad catalítica α (GenBank: Q13131, P54646) y dos subunidades reguladoras β (GenBank NP006244) y γ (GeneBank: NP997626). En mamíferos se han identificado dos isoformas de la subunidad α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), dos isoformas de la β ($\beta 1$ y $\beta 2$) y tres de la γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$) (Fig. 7), por lo que a partir de estas y de diferentes formas de procesamiento de los ARNm que codifican para dichas proteínas, se pueden

originar hasta doce combinaciones diferentes (Blanco Martinez de Morentin et al., 2011; Canto and Auwerx, 2010; Pimentel et al., 2013; Ramamurthy and Ronnett, 2012; Stark et al., 2013; Xiao et al., 2011) (Fig. 7).

Las dos isoformas α contienen el dominio quinasa en el extremo N-terminal. La fosforilación/defosforilación del residuo Thr 172 regula su actividad catalítica. Por otro lado, el extremo C-terminal es requerido para la formación del complejo con las subunidades β y γ (Fig. 7). Las subunidades β contienen 2 regiones conservadas, localizadas en las regiones central y C-terminal. El dominio C-terminal permite la unión de las otras 2 subunidades (α y γ) para formar el complejo funcional regulado por AMP, y la región central es un sitio de unión a glucógeno (Glycogen Binding Domain, GBD) (Fig. 7). Las subunidades γ contienen regiones variables en la región N-terminal seguidas de 4 repeticiones de una secuencia denominada motivos CBS (Cistationina β -Sintasa). Cada pareja de estos motivos une cooperativamente una molécula de AMP, de forma que un sitio no tiene afinidad por el AMP hasta que el nucleótido se ha unido al otro sitio, lo que hace que la AMPK sea altamente sensible a pequeños cambios en los niveles de AMP. Además estos motivos pueden unir ADP y ATP con similar afinidad (Blanco Martinez de Morentin et al., 2011; Canto and Auwerx, 2010; Pimentel et al., 2013; Ramamurthy and Ronnett, 2012; Stark et al., 2013; Xiao et al., 2011) (Fig. 7).

La expresión de las distintas combinaciones de las diferentes subunidades de la AMPK es dependiente del tipo celular o del tejido. Así, en el músculo esquelético están presentes 3 tipos de complejos y además, su actividad es diferente dependiendo de la intensidad y de la duración del ejercicio físico. La expresión de la subunidad $\alpha 2$ se ha localizado en células β -pancreáticas, neuronas, músculo esquelético y corazón. En el hígado hay un 50% de cada una de las isoformas de AMPK α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), y en el tejido adiposo se expresa en mayores niveles la isoforma AMPK $\alpha 1$ que la $\alpha 2$.

La combinación de las distintas isoformas condiciona tanto la distribución intracelular de la proteína como la afinidad de esta quinasa por los sustratos sobre los que actúan. Así, los complejos que contienen AMPK $\alpha 2$ se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma, sin embargo, los complejos AMPK $\alpha 1$ están localizados principalmente en el citoplasma pero también han sido observados en la membrana plasmática de determinados tipos celulares. Algunas subunidades de la AMPK como, por ejemplo, la subunidad $\alpha 2$, se han encontrado en el

compartimento nuclear, sugiriendo que podría estar implicada en la regulación de la expresión de determinados genes. Su presencia en el núcleo podría ser debida a una señal de localización nuclear presente en la subunidad $\alpha 2$ (que no se encontraría en $\alpha 1$), aunque esta afirmación es controvertida, ya que la subunidad $\alpha 1$ puede también translocarse al núcleo (Canto and Auwerx, 2010; Steinberg and Kemp, 2009; Towler and Hardie, 2007).

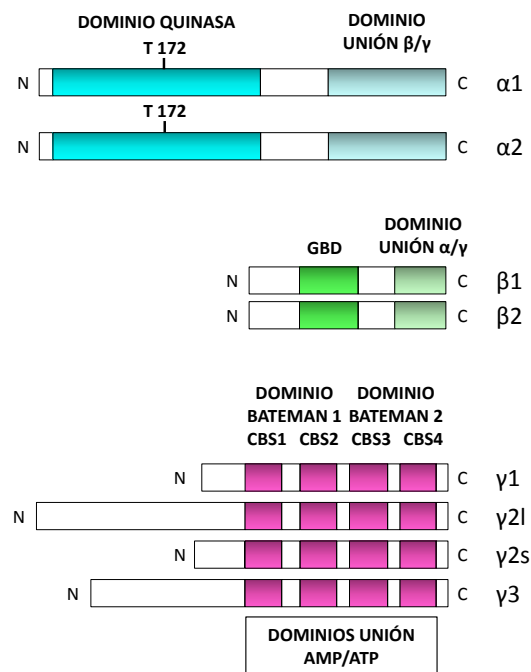


Figura 7. Esquema representativo de los dominios de las diferentes isoformas de las subunidades α , β y γ de la AMPK. GBD (Dominio de unión a glucógeno), CBS (Cistationina β -Sintasa).

Cualquier estrés metabólico que reduzca la producción de ATP (shock térmico, hipoxia, isquemia, ausencia de glucosa...), o acelere el consumo del mismo (contracción muscular) incrementará el cociente ADP/ATP, lo que se verá amplificado por la acción de la adenilato quinasa produciendo un incremento del cociente AMP/ATP, con la consecuente activación de la AMPK. Una vez activa, la AMPK actúa inhibiendo las vías anabólicas responsables de la síntesis de macromoléculas (proteínas y glucógeno) y de lípidos (ácidos grasos, triglicéridos y colesterol), y activando las catabólicas, como la β -oxidación de los ácidos grasos, la captación de glucosa y la glucólisis cardíaca. El resultado neto de la actividad de la AMPK es el restablecimiento del balance energético.

En general, la mayoría de las células van a expresar transportadores de glucosa que tienen alta afinidad por el ligando (baja K_m). De este modo, la síntesis de ATP mediante metabolización de glucosa sólo se detiene cuando los niveles son patológicamente bajos. Sin embargo, las células sensoras de glucosa (células β -pancreáticas y algunas neuronas hipotalámicas implicadas en el control de la ingesta) pueden expresar transportadores de glucosa de baja afinidad y alta K_m (GLUT-2), así como la GK (hexoquinasa de alta K_m) (Navarro et al., 1996), lo que permite que el ATP disminuya cuando la concentración de glucosa desciende aún dentro de un rango fisiológico. Esto permite que, en estas células, la AMPK pueda ser activada o inhibida de una forma mucho más precisa por disminución o elevación de los niveles de glucosa respectivamente, incluso dentro del rango fisiológico (Towler and Hardie, 2007).

La activación del complejo AMPK ocurre por tres mecanismos independientes (Blanco Martinez de Morentin et al., 2011; Canto and Auwerx, 2010; Lim et al., 2010; Steinberg and Kemp, 2009; Towler and Hardie, 2007)(Fig. 8):

➤ **Activación alostérica:** La AMPK puede ser regulada de forma alostérica cuando el AMP se une a la subunidad γ . Esto estabiliza el complejo para su modificación covalente mediante fosforilación de la subunidad catalítica impidiendo a su vez la defosforilación y, por tanto, la inactivación de la proteína. Recientes estudios han demostrado que la unión de AMP o ADP a la subunidad γ conserva la forma fosforilada (y activa) de esta quinasa. Sin embargo, cuando existe elevada concentración de ATP, este se une a la subunidad γ y se produce la defosforilación en la subunidad α , inactivando la quinasa (Fig. 8B).

La unión de AMP hace a la AMPK un sustrato poco afín para la fosfatasa y, por lo tanto, la fosforilación en el residuo Thr 172 de la subunidad α se ve incrementada. La subunidad γ contiene tres sitios de unión para el AMP. Dos de esos tres sitios pueden unir tanto AMP como ATP, mientras que el tercer sitio contiene un AMP ligado estrechamente no intercambiable. En condiciones fisiológicas, cuando la AMPK se encuentra inactiva, la subunidad γ une dos moléculas de ATP y una molécula de AMP, mientras que en estado de baja energía, se unen tres moléculas de AMP (Fig. 8A).

Debido a la reacción catalizada por la adenilato quinasa, se produce la transformación de dos moléculas de ADP en una molécula de ATP y un AMP, por lo que el ratio AMP/ATP es un reflejo muy sensible de los trastornos metabólicos de la célula. Ello convierte a la AMPK en un sensor muy preciso del equilibrio energético (Fig. 8A y B).

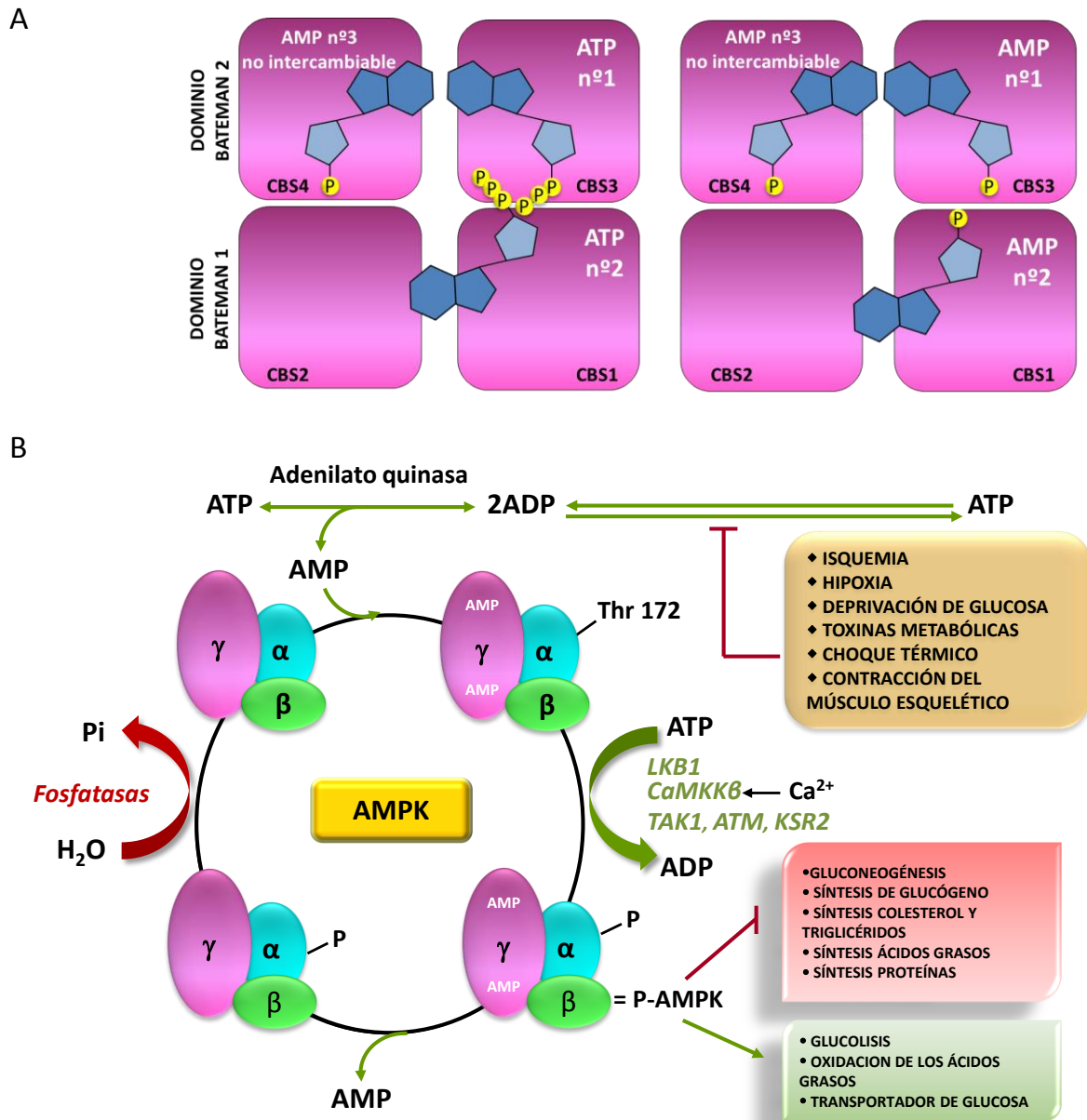


Figura 8. Esquema representativo de la regulación del complejo AMPK. Adaptado de (Lim et al., 2010)

➤ **Modificación covalente:** Se produce por la fosforilación del residuo Thr 172 de la subunidad α , aumentando unas 100 veces la actividad de la enzima. Una de las quinasas que fosforila y activa la AMPK es un supresor tumoral (quinasa hepática B1, LKB1). En neuronas, células endoteliales y linfocitos, la AMPK puede ser también activada por la elevación en la concentración de Ca^{2+} intracelular. En este caso, la proteína responsable de la fosforilación en el residuo Thr 172 es la quinasa de la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina I y IV (CaMKK2), o β . Además, ensayos realizados *in vitro* e *in vivo* han demostrado que otras quinasas, como la quinasa TAK1, que es activada por el factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF}\beta$), puede también activar a la AMPK (Fig. 8B). Además de estas quinasas moduladoras de la actividad de AMPK, se han descrito otras que pueden regular su actividad, tales como la serina/treonina quinasa ATM (acrónimo de *Ataxia Telangiectasia Mutated*), que es activada por lesiones en el ADN, o la proteína quinasa supresora de Ras (KSR2) que actúa como una proteína de anclaje para la coordinación de las señales de la vía de las MAPKs (Fig. 8B).

➤ **Inhibición de la defosforilación** por las proteínas fosfatasas, como la PP2C α . Los niveles de fosforilación de la AMPK dependen también de la actividad de las proteínas fosfatasas. Un incremento en los niveles de AMP conducen a la inhibición de la actividad fosfatasa. Ello, junto con el hecho de que la LKB1 es constitutivamente activa, hace que la respuesta después de un incremento de AMP potencie la fosforilación de la Thr 172 y la activación de la AMPK.

Recientemente se ha postulado que la AMPK podría actuar como un sensor de glucógeno que inhibiría la fosforilación inducida por LKB1 y CaMKK β , mientras que no afectaría a la defosforilación. Además, se ha propuesto un nuevo modelo de regulación de la AMPK que es independiente de AMP, mediante el cual un efector A inducido por muerte celular (*Cell Death Activator*, CIDE-A) formaría un complejo con la subunidad β de la AMPK dando lugar a la degradación por ubiquitinación de la quinasa.

Por tanto, el AMP convierte a la AMPK en mejor sustrato para la LKB1 y peor sustrato para la proteína fosfatasa, que defosforila la Thr 172, manteniendo así la fosforilación de este residuo y por ende la activación de la quinasa.

Este triple mecanismo de regulación descrito asegura una respuesta extremadamente sensible a pequeños incrementos en AMP. Los tres efectos que

activan la AMP son antagonizados por un incremento en la concentración de ATP, de manera que el sistema no responde solamente a incrementos en la concentración de AMP, sino también a incrementos del cociente AMP/ATP.

Gracias a todas estas características, la AMPK detecta cambios del estado energético celular producidos en respuesta a variaciones nutricionales. Puesto que es activada por un estado energético pobre, la AMPK tiene, además, un papel fundamental en la regulación de todas las vías metabólicas, que a su vez dependen de los requerimientos de ATP. Generalmente las rutas metabólicas contienen una o varias enzimas que pueden ser activadas e inhibidas de forma alostérica por AMP, además de otras que son objeto de modificación covalente mediante fosforilación catalizada por la AMPK.

3.2.2 *Papel de la AMPK en tejidos periféricos*

En muchos tejidos, la activación de la AMPK es un mecanismo contra-regulatorio que inhibe los procesos anabólicos y activa los procesos catabólicos con el fin de restaurar el ratio AMP/ATP (Fig. 9).

– AMPK y metabolismo de carbohidratos

La AMPK desempeña un papel decisivo en el metabolismo de los carbohidratos (Blanco Martinez de Morentin et al., 2011; Canto and Auwerx, 2010; Lage et al., 2008; Steinberg and Kemp, 2009).

En el **músculo cardíaco**, la activación de la AMPK (por isquemia o farmacológica) resulta en un incremento de la translocación del transportador de glucosa GLUT-4, lo que aumenta la captación de glucosa. Además, puede incrementar la glucólisis a través de la fosforilación de la 6-fosfofructoquinasa-2 (PFK-2).

En el **músculo esquelético**, la activación de la AMPK incrementa la captación de glucosa, aumentando la expresión del GLUT-4 y de la hexoquinasa II. Asimismo, la estimulación de la AMPK por el ejercicio mejora la sensibilidad a la insulina, puesto que: i) fosforila a IRS-1 activando la vía PI3K y ii) regula la actividad de otras proteínas quinasas que fosforilan IRS-1 inhibiendo esta ruta. Por otro lado, la AMPK regula la síntesis de glucógeno, ya que fosforila e inhibe a la glucógeno sintasa (GS).

En el **hígado**, el resultado neto de la actividad de la AMPK es una disminución de la gluconeogénesis, ya que la AMPK (regula negativamente) inhibe la transcripción de varias enzimas de la vía gluconeogénica: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) y la L-piruvato quinasa (L-PK).

— AMPK y metabolismo lipídico

La AMPK es un modulador clave del metabolismo lipídico, de hecho una de las dianas mejor caracterizadas de la AMPK es la vía de síntesis de los ácidos grasos en hígado e hipotálamo (Blanco Martínez de Morentin et al., 2011; Canto and Auwerx, 2010; Lage et al., 2008; Steinberg and Kemp, 2009) (Fig. 9).

La activación farmacológica de la AMPK incrementa la oxidación de ácidos grasos en el **músculo esquelético** y **cardiaco**. La AMPK activada fosforila e inhibe a la acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1) dando lugar a la reducción de los niveles de malonil-CoA (producto de la ACC), que es un potente inhibidor alostérico de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1). La CPT1 facilita el transporte de los ácidos grasos activados a la matriz mitocondrial para su degradación. La AMPK también inhibe la síntesis de ácidos grasos, puesto que: i) reduce la actividad de la ácido graso sintasa (FAS) y disminuye además su síntesis inhibiendo la transcripción estimulada por la glucosa del factor de transcripción denominado proteína de unión al elemento regulador de esteroides (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*, SREBP-1C) y ii) activa la malonil-CoA descarboxilasa (MCD) reduciendo de este modo el flujo de sustratos en la vía de síntesis de ácidos grasos.

Así pues, en el **hígado**, **hipotálamo** y en **músculo** durante el ejercicio, la AMPK activada no sólo inhibe la síntesis de ácidos grasos sino que también activa la β -oxidación de los ácidos grasos mediante la reducción de los niveles de malonil-CoA. En los hepatocitos la AMPK inactiva, además de a la ACC, también a la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa e inhibe la síntesis de colesterol.

En el **tejido adiposo**, la AMPK inhibe la lipólisis a través de la fosforilación directa de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y por el bloqueo de la proteína quinasa A (PKA) inducida por la activación de HSL. Sin embargo, existen datos recientes en conflicto con esta idea que muestran que la AMPK estimula la lipólisis en los adipocitos a través de la fosforilación de la HSL.

– AMPK y metabolismo de proteínas

La AMPK inhibe la síntesis de proteínas actuando en diferentes puntos (Steinberg and Kemp, 2009). Por un lado fosforila y activa a la proteína eEF-2K, que fosforila al factor eEF-2, inhibiendo la síntesis de proteínas. Por otro lado, la activación de la AMPK contrarresta los efectos producidos por la activación de mTOR inhibiendo la síntesis de proteínas en el músculo esquelético, hígado y músculo cardíaco. Así, la AMPK inhibe la vía mTOR por diferentes mecanismos (Fig. 9):

- Puede fosforilar al complejo supresor de tumores (TSC1/TSC2), que regula negativamente al complejo mTORC1 inhibiendo a la GTPasa Rheb. La fosforilación de TSC1/TSC2 también puede mediar efectos de autofagia.
- La AMPK fosforila directamente a RAPTOR, una proteína vinculante al complejo mTORC1, que se separa físicamente del complejo inhibiéndolo.
- Un efecto de la inhibición de mTOR por la AMPK es la disminución de la actividad de la S6K, sustrato directo de mTOR, el cual es un regulador negativo de IRSs en la vía de señalización de la insulina, lo que explicaría los efectos positivos de la AMPK en la sensibilidad a la insulina después del ejercicio.

– AMPK en células β -pancreáticas

En las células β -pancreáticas, la activación de la AMPK provoca una disminución de la liberación de insulina, en parte disminuyendo la movilización de las vesículas secretoras a la superficie celular y en parte suprimiendo el incremento de la concentración de ATP libre en el citosol y de Ca^{2+} intracelular libre inducido por glucosa (Rutter and Leclerc, 2009).

– AMPK y vascularización

Una diana de la AMPK que puede ser particularmente importante en el sistema vascular es la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa (eNOS). Dado que el efecto clásico del NO es relajar la musculatura del revestimiento de los vasos sanguíneos, se convierte en un mecanismo para aumentar el flujo de sangre a tejidos hipóxicos. En este sentido, la activación de AMPK en células endoteliales

aórticas humanas provoca un aumento de la fosforilación de la eNOS en Ser 1177 y el aumento de la producción de NO. La AMPK también puede ser importante en el proceso de angiogénesis (Towler and Hardie, 2007).

– Otros efectos biológicos de la AMPK

La AMPK ha sido identificada como uno de los principales reguladores de la biogénesis mitocondrial en respuesta a una disminución crónica de energía. Una reducción en la densidad mitocondrial se considera un factor crítico que contribuye a la acumulación intramuscular de lípidos y a la resistencia a insulina. La AMPK produce la biogénesis mitocondrial regulando un grupo de factores de transcripción, incluyendo el PGC1 α (co-activador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ), que es un regulador de la expresión de genes implicados en el metabolismo energético. La activación de PGC1 α induce la transcripción de los factores nucleares respiratorio 1 (NRF-1) y NRF-2, que a su vez son reguladores transcripcionales críticos de genes nucleares que codifican para los complejos de la cadena transportadora de electrones (Canto and Auwerx, 2010; Steinberg and Kemp, 2009).

Por otro lado, la AMPK juega un papel importante en la regulación del crecimiento y proliferación celular, así como en la reprogramación metabólica y recientemente se ha relacionado también con procesos celulares como la autofagia y la regulación de la polaridad celular y del flujo iónico (Mihaylova and Shaw, 2011; Steinberg and Kemp, 2009). Estudios adicionales implican a la AMPK en la regulación de factores de transcripción y co-activadores que están implicados en el crecimiento celular y la proliferación. Los efectos de la AMPK en el crecimiento celular pueden ser mediados por diversos mecanismos, específicos de cada tejido, lo que dificulta el entendimiento de las vías principales que están involucradas en este proceso (Mihaylova and Shaw, 2011; Steinberg and Kemp, 2009).

La activación de la AMPK regula, asimismo, la expresión de determinados genes tanto a nivel transcripcional, como a nivel traduccional. Varios reguladores transcripcionales han sido identificados como dianas de la AMPK, y se está empezando a dilucidar el mecanismo por el cual esta quinasa regula la expresión de estos genes (Canto and Auwerx, 2010; Mihaylova and Shaw, 2011).

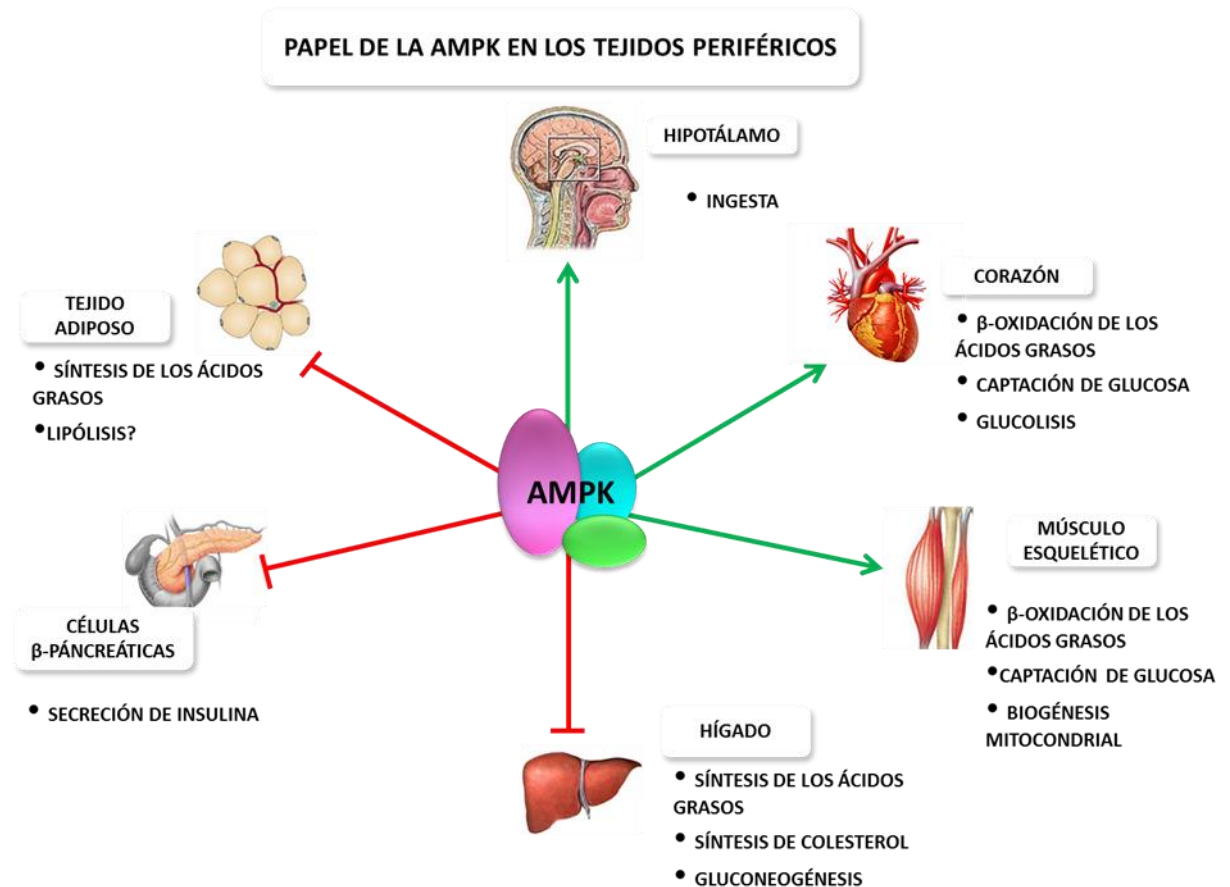


Figura 9. Dianas de la AMPK y sus efectos biológicos.

3.2.3 Papel de la AMPK hipotalámica en el control de la ingesta

Los primeros estudios histológicos revelaron que las subunidades de la AMPK se expresan abundantemente en el cerebro de roedores en desarrollo y en adulto. Aunque las neuronas representan una minoría de células en el cerebro, parece ser que estas células están enriquecidas en AMPK. Evidencias histológicas indican que la expresión de la AMPK es muy elevada en ARC, PVN, VMH y LH. La AMPK hipotalámica actúa como un "integrador energético" y percibe no solo el estado energético celular, sino que también se le atribuye un papel en los mecanismos reguladores de la homeostasis energética de todo el organismo (Blanco Martinez de Morentin et al., 2011; Ramamurthy and Ronnett, 2012).

La isoforma que contiene la subunidad catalítica $\alpha 2$ es la más predominante en el cerebro y está localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo de las neuronas de diferentes regiones cerebrales. Los complejos con subunidades $\beta 1$ y $\gamma 1$

muestran también una localización preferentemente nuclear, mientras que la $\beta 2$ y $\gamma 2$ son principalmente citosólicas.

El papel de la AMPK en la regulación de la ingesta y el balance energético fue elucidado por varios grupos de investigación. En estos estudios se observa que el ayuno y hormonas orexigénicas como la grelina incrementan la actividad hipotalámica de la AMPK, mientras que la alimentación y hormonas anorexigénicas como la leptina disminuyen la actividad de la esta quinasa. La activación de la AMPK promueve, por lo tanto, la ingesta de alimentos, mientras que la disminución de su actividad enzimática está asociada a hipofagia. Así, la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de la AMPK es suficiente para producir un incremento de la ingesta de alimentos, mientras que la sobreexpresión del dominante negativo de la proteína conduce a una reducción de la ingesta y del peso corporal. Este efecto es debido, al menos en parte, a un incremento de la expresión de NPY y de AgRP en el núcleo arqueado y de la MCH en el hipotálamo lateral (Minokoshi et al., 2002).

El ayuno y la ingesta están acompañados por variaciones hormonales y de nutrientes tanto en tejidos periféricos como en el SNC, lo que puede llevar a alteraciones en la actividad de la AMPK. De este modo, la AMPK es capaz de integrar información nutricional y señales hormonales.

➤ *AMPK hipotalámica y señales anorexigénicas*

La AMPK hipotalámica puede estar regulada por numerosas señales anorexigénicas que indican un exceso de nutrientes. De este modo, la **alimentación**, la **hiperglucemia**, la **leptina**, la **insulina**, la **resistina**, el **GLP-1**, la **α -MSH**...son algunas moléculas anorexigénicas que inhiben la AMPK hipotalámica (Fig. 10) (Fig. 11). Los efectos de estos péptidos pueden producirse de forma específica en los diferentes núcleos hipotalámicos. Así, la leptina inhibe la actividad de la AMPK en neuronas NPY/AgRP del ARC y en PVN, y su inhibición es necesaria para el efecto anorexigénico del péptido, mientras que las altas concentraciones de glucosa o la insulina inhiben a la AMPK en otras regiones hipotalámicas. Las señales transmitidas a través de los receptores de melanocortina-4 (MC4-R), otro potente péptido anorexigénico, parecen ser necesarias para observar el efecto de la leptina y de la alimentación sobre la actividad de la AMPK en el PVN (Fig.10) (Fig.11).

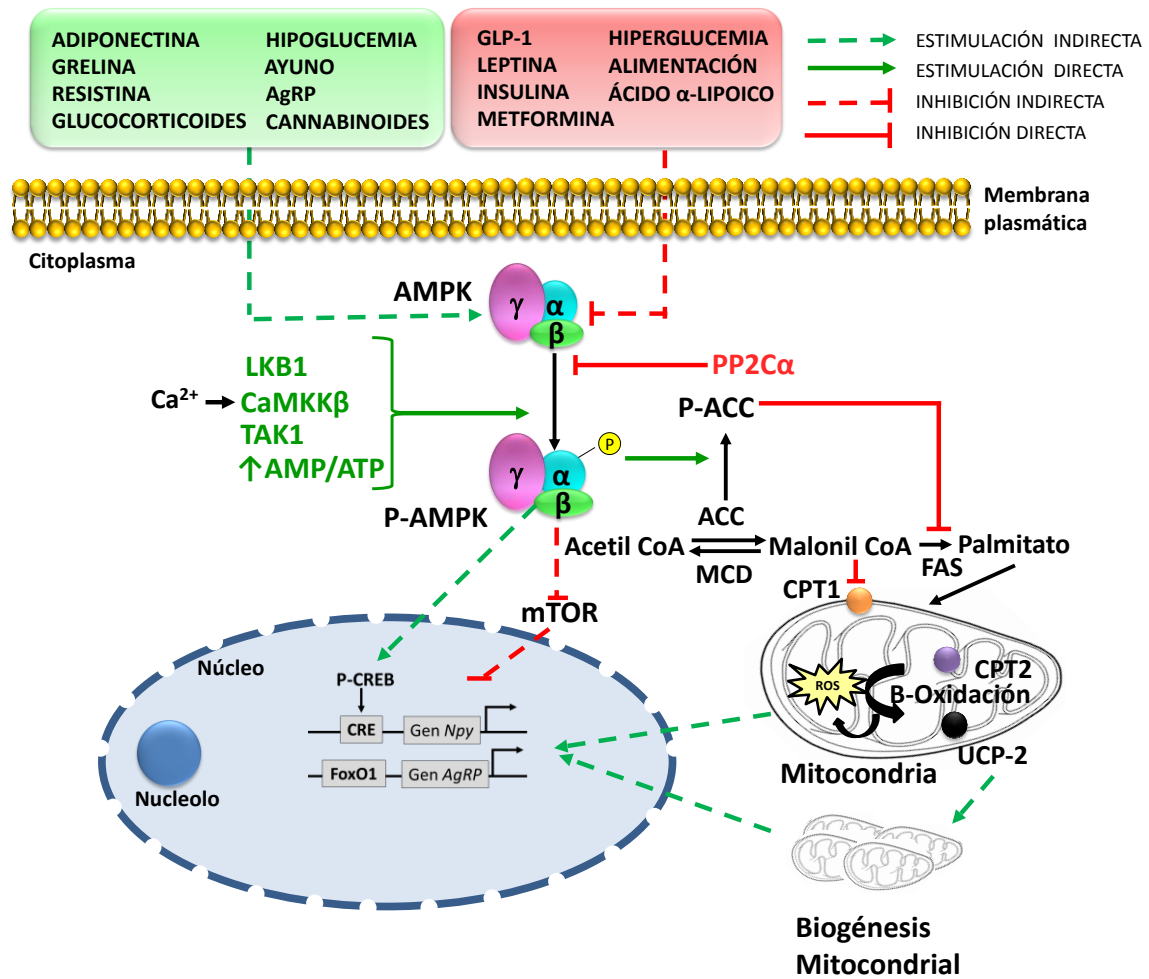


Figura 10. Múltiples hormonas, péptidos, nutrientes y estados metabólicos alterados regulan la actividad de la AMPK en el hipotálamo. En el hipotálamo, las señales anorexigénicas inhiben la fosforilación y activación de la AMPK, mientras que las señales orexigénicas la activan. Estas señales son integradas, y probablemente se traducen en alteraciones en las vías de la LKB1 y la CaMKKβ. Cambios en la actividad de la AMPK podrían actuar a través de la vía ACC-malonyl CoA-CPT1 regulando la ingesta. En particular, la grelina activa a la AMPK, que a su vez inhibe a la ACC, disminuyendo la cantidad de malonyl CoA. El resultado neto es el incremento en la actividad de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), y por lo tanto en la β-oxidación de los ácidos grasos, que promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y posterior actividad de la proteína desacoplante 2 (UCP-2). UCP-2 juega un papel crítico en la biogénesis mitocondrial mejorando la capacidad bioenergética de las neuronas NPY, y asegurando la transcripción eficiente de importantes genes (*Npy*, *AgRP*) en la función neuronal. P-CREB (proteína de unión al elemento de respuesta AMPc) y FoxO1 (*Forkhead Box O1*) son importantes factores de transcripción involucrados en la activación de NPY y AgRP. Otra vía de la AMPK es mTOR, mediando los efectos de la AMPK en el balance energético y homeostasis de la glucosa. Adaptado de (Blanco Martínez de Morentin et al., 2011).

El ácido α -lipoico suprime la fosforilación de la AMPK en el ARC, pero no en el PVN ni en el LH. Algunos estudios muestran que la inhibición de la AMPK por el ácido lipoico está también asociada con la disminución de la fosforilación en las dianas de la AMPK. En consecuencia, la ACC se activa incrementando los niveles del malonyl CoA e inhibiendo la CPT1 mitocondrial y, por lo tanto, la oxidación de los ácidos grasos (Blanco Martínez de Morentin et al., 2011; Stark et al., 2013) (Fig. 10) (Fig. 11).

➤ *AMPK hipotalámica y señales orexigénicas*

Por el contrario, el **ayuno**, la **hipoglucemia**, la **grelina**, la **adiponectina**, **AgRP**, los **cannabinoides** y **glucocorticoides** estimulan la actividad de la AMPK. Estudios llevados a cabo en líneas celulares hipotalámicas apuntan a que la adiponectina incrementa la fosforilación de la AMPK y ACC e incrementa la expresión del ARNm de AgRP. Los cannabinoides estimulan la ingesta actuando en el VMH y la grelina actúa en receptores localizados en el ARC (incrementando el Ca^{2+} citosólico, que activaría a la $\text{CaMK}\beta$ y, por lo tanto, a la AMPK) y en el VMH. Los glucocorticoides estimulan la expresión génica de *Npy* y *AgRP* en el ARC vía AMPK (Blanco Martinez de Morentin et al., 2011; Stark et al., 2013) (Fig. 10) (Fig. 11).

3.2.4 AMPK como diana de drogas, hormonas, nutrientes y otros ligandos extracelulares

Los tejidos periféricos se han convertido en factores clave en relación al metabolismo energético a través de la liberación de sustratos y hormonas, tales como: insulina, adipoquinas (leptina y adiponectina), resistina, grelina, hormonas tiroideas, endocannabinoides y glucocorticoides, los cuales están involucrados en el metabolismo y la sensibilidad a la insulina. Muchos de los efectos metabólicos de estas hormonas están mediados por la AMPK (Fig. 11).

Los efectos de diferentes hormonas y mediadores inflamatorios sobre la AMPK son complejos y en algunos casos son opuestos en tejidos periféricos y a nivel del SNC (Fig. 11).

Algunos ejemplos de acciones opuestas sobre la AMPK incluyen los efectos de las adipoquinas (leptina y adiponectina) que activan a la $\text{AMPK}\alpha 2$ en el músculo esquelético, sin embargo, la leptina al igual que la insulina inhibe la AMPK en los núcleos arqueado y paraventricular hipotalámicos. En el hígado, la adiponectina estimula la AMPK promoviendo la oxidación de los ácidos grasos, mientras que la resistina la inhibe, impidiendo la gluconeogénesis. Otros agentes orexigénicos como la grelina y los cannabinoides activan la AMPK en el hipotálamo estimulando la ingesta. Elevados niveles de glucosa inhiben la actividad de la AMPK en todos los tejidos estudiados. Además, se ha descrito que

la glucosa estimula la proteína fosfatasa PP2 α (que inactiva a la AMPK) (Kola et al., 2006; Lage et al., 2008; Lim et al., 2010; Stark et al., 2013) (Fig. 11).

El síndrome metabólico se caracteriza por la aparición de una resistencia a insulina, hipertrigliceridemia, obesidad abdominal, hipertensión, bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Tanto los genes que regulan el metabolismo de los carbohidratos o de lípidos como las dianas sobre las que actúa la AMPK juegan un papel importante en las características del síndrome metabólico. Por ello, la AMPK es considerada una diana para el tratamiento de este síndrome (Lim et al., 2010).

En conjunto, la activación de AMPK en el músculo esquelético, hígado y tejido adiposo da lugar a un entorno metabólico favorable para la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 2, es decir, disminución de la glucosa circulante, reducción de los lípidos plasmáticos, disminución en la acumulación ectópica de grasa, así como una mayor sensibilidad a la insulina. Debido a estas acciones, la utilización de activadores de AMPK tiene gran interés terapéutico. Ejemplos de estos activadores son:

- El **AICAR** (5 aminoimidazol 4 carboxamida ribósido), que es captado por las células utilizando el transportador de adenosina y convertido por la adenosina quinasa en el nucleótido fosforilado ZMP, el cual mimetiza los efectos del AMP en el sistema AMPK.
- La **rosiglitazona**, que activa a la AMPK aumentando el ratio AMP/ATP. La rosiglitazona pertenece a una clase de medicamentos anti-diabéticos conocidos como tiazolidinedionas (**TZD**), que se utilizan para revertir la resistencia a la insulina y mejorar la tolerancia a la glucosa. Se cree que estos efectos pueden ser mediados directamente por la activación de la AMPK o indirectamente reduciendo los niveles de resistina y estimulando la liberación de adiponectina (Lim et al., 2010).
- Por último, la **metformina (biguanida)** ejerce diferentes efectos según el tipo celular. Por ejemplo, activa a la AMPK en hígado y músculo, lo que conlleva la captación de glucosa por el músculo, la oxidación de los ácidos grasos hepáticos, la inhibición de la gluconeogénesis y la expresión de enzimas lipogénicas (Lim et al., 2010).

Las acciones de estas drogas, junto con los efectos de nutrientes y hormonas en la activación de la AMPK en los distintos tejidos se resumen en la Figura 11.






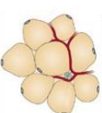
ACTIVACIÓN DE AMPK		INHIBICIÓN DE AMPK	
ADIPONECTINA GRELINA RESISTINA GLUCOCORTICOIDES CANNABINOIDES	↑ APETITO		↓ APETITO
ADIPONECTINA GRELINA CANNABINOIDES	↑ CAPTACIÓN DE GLUCOSA		↓ CAPTACIÓN DE GLUCOSA
ADIPONECTINA LEPTINA ROSIGLITAZONA METFORMINA	↑ CAPTACIÓN DE GLUCOSA		↓ CAPTACIÓN DE GLUCOSA
ADIPONECTINA LEPTINA METFORMINA GLUCOCORTICOIDES	↓ GLUCONEOGÉNESIS		↑ GLUCONEOGÉNESIS
ADIPONECTINA METFORMINA	↓ LIBERACIÓN DE INSULINA		↑ LIBERACIÓN DE INSULINA
LEPTINA ADIPONECTINA ROSIGLITAZONA	↓ ACUMULACIÓN ÁCIDOS GRASOS		↑ ACUMULACIÓN ÁCIDOS GRASOS

Figura 11. La AMPK como diana de drogas nutrientes y hormonas.

Es, por lo tanto, un gran reto para las empresas farmacéuticas poder obtener un activador seguro y eficaz de la AMPK. Sin embargo, también hay que destacar que hay ciertas dificultades asociadas con la AMPK que la hacen una diana farmacológica difícil: i) la AMPK es una proteína heterotrimérica y hasta ahora no hay una estructura cristalizada disponible, ii) cada subunidad contiene dos o más isoformas y iii) el sitio de unión de AMP no está bien definido. A pesar de estas limitaciones varias compañías farmacéuticas están llevando a cabo estudios preclínicos con esta diana.

3.3 Papel de la vía mTOR/S6K1 y AMPK hipotalámicas en la regulación de la ingesta

La ingesta de alimentos conduce a períodos de ayuno y de alimentación que están asociados con cambios sustanciales en el nivel de nutrientes disponibles (por ejemplo, glucosa y aminoácidos) y variaciones en los niveles de hormonas y péptidos gastrointestinales. Varios estudios describen el efecto de la glucosa en ambos sensores metabólicos, AMPK y mTOR, en áreas hipotalámicas. Durante el ayuno la disminución de la concentración de nutrientes activa a la AMPK y se mantiene inactivo el complejo mTOR, mientras que tras la ingesta de alimentos la actividad de estos sensores se invierte.

Se ha descrito que la disminución de la glucosa intracelular a través de la captación de 2-desoxiglucosa aumenta la actividad de la AMPK hipotalámica y la ingesta de alimentos. Por el contrario, la hiperglucemia la disminuye. También se observó que la actividad de la AMPK se inhibe en los núcleos ARC, VMH, LH, DMH y PVN por niveles altos de glucosa y en condiciones de re-alimentación. Aumentos en la actividad de la AMPK α 2 en el núcleo arcuato-ventromedial y en el núcleo PVN se detectan también durante la hipoglucemia inducida por insulina en ratas. Sin embargo, ratas en ayunas registran una disminución en el número de células hipotalámicas que expresan las formas activadas de mTOR y S6K1 específicamente en el núcleo ARC, respondiendo así a la disponibilidad de nutrientes. Además, la activación constitutiva de S6K en el área medio-basal hipotalámica protege contra los efectos nocivos de una dieta alta en grasas (Blouet et al., 2008; Xu et al., 2012).

También se ha establecido que la AMPK y mTOR están implicados en el efecto anorexigénico inducido por dietas ricas en proteínas. Por lo tanto, una dieta alta en proteínas y la administración icv de leucina disminuye la fosforilación de AMPK y activa mTORC1 en el hipotálamo de rata (Pimentel et al., 2013).

La AMPK regula el balance energético actuando en neuronas AgRP y POMC en el ARC. La delección del gen de la subunidad α 2 de la AMPK en neuronas AgRP causa un fenotipo delgado con un incremento en la sensibilidad a agonistas de la melanocortina, pero no se producen cambios diarios en la ingesta de alimentos *ad libitum*. Por otro lado, la delección de la AMPK α 2 en neuronas POMC reduce el gasto energético e incrementa el peso corporal. Además

deleciones de la AMPK α 2, tanto en neuronas POMC como en neuronas AgRP, revelan una respuesta electrofisiológica normal frente a leptina o insulina, pero muestran una respuesta celular alterada frente a la aplicación de glucosa extracelular. Ratones deficientes para la adiponectina muestran un incremento en la actividad de la AMPK en ARC, disminuyendo la ingesta e incrementando el gasto energético, y mostrando resistencia a la obesidad inducida por dieta rica en grasas. Estos estudios destacan que la AMPK afecta al metabolismo energético hipotalámico regulando el balance energético de las neuronas AgRP y POMC a largo plazo, y su disfunción produce fenotipos delgados u obesos respectivamente (Claret et al., 2007; Stark et al., 2013).

Con el fin de sobrevivir en periodos de escasez de alimentos o balance energético negativo es necesario sentir la sensación de hambre y mantener activa esa señal. Para ello, la escasez de alimentos se traduce molecularmente en la activación de la AMPK, que permitiría preservar el apetito durante estados de balance energético negativo (Stark et al., 2013).

En resumen, la activación de la AMPK inhibe la vía de señalización mTOR, que ya hemos descrito que desempeña un papel importante en la regulación de la ingesta de alimentos y peso corporal en el hipotálamo, sugiriéndose que AMPK y mTOR podrían tener funciones opuestas en el control de la conducta alimentaria (Cota et al., 2006) (Fig. 7).

3.4 PASK. Regulación y función

La PASK, también denominada PASKIN, se define como la proteína quinasa que contiene dominios PAS (Per-Arnt-Sim), y es un sensor de nutrientes cuya secuencia se encuentra altamente conservada desde levaduras hasta humanos. Al igual que la AMPK y mTOR es una proteína respondedora de nutrientes que regula el metabolismo de la glucosa y la energía celular y, además, actúa como un sensor del ambiente intracelular capaz de detectar gran variedad de parámetros ambientales como la luz, el oxígeno y el estado redox (Cardon and Rutter, 2012).

En los mamíferos, se ha propuesto que PASK se activa por pequeños metabolitos y podría regular la síntesis de glucógeno y la traducción de proteínas, además de estar involucrada en la regulación de la homeostasis de la glucosa y el metabolismo energético (da Silva Xavier et al., 2011; Grose and Rutter, 2010;

MacDonald and Rorsman, 2011; Schlafli et al., 2009; Schlafli et al., 2011). Por otro lado parece que los efectos en la activación de la PASK son específicos de tejido.

La expresión de PASK en tejidos de ratón es ubicua, aunque con niveles bajos, exceptuando en testículo, donde es muy elevada (Grose and Rutter, 2010) y su localización celular es predominantemente citoplásmica.

3.4.1 PASK. Estructura y regulación celular

La PASK contiene 2 dominios PAS N-terminales (PAS A y PAS B) y un dominio catalítico con actividad quinasa en el extremo C-terminal regulado por fosforilación en 2 residuos de treonina.

Al igual que ocurre con otros dominios PAS, el dominio PAS de la PASK adopta un pliegue característico que permite la unión de pequeñas moléculas orgánicas dentro de su núcleo hidrofóbico. Sin embargo, a diferencia de otros, el ligando fisiológico para esta quinasa sigue siendo desconocido. Experimentos realizados *in vitro* indican que este dominio tendría una función inhibidora sobre la actividad quinasa (Cardon and Rutter, 2012) (Fig. 12).

El extremo C-terminal de la PASK contiene un dominio serina/treonina quinasa. Es de suponer que la actividad quinasa es el modo principal por el cual la PASK media sus efectos celulares, como se ha demostrado en levaduras. Muchas proteínas quinasas pasan de una conformación inactiva a una conformación activa por la fosforilación de uno o más residuos en el bucle situado dentro del dominio de quinasa, conocido como **bucle de activación**. La mayoría de proteínas ortólogas de PASK poseen un residuo de treonina fosforilable en este bucle. (Fig. 12).

En cuanto a los ligandos endógenos, se han encontrado varios **fosfolípidos** que pueden unirse a la PASK y producir autofosforilación como el fosfatidil inositol monofosfato, que interactúa con el dominio quinasa de la PASK, sin embargo, la autofosforilación de PASK se encuentra inhibida por fosfatidil inositoles di y tri fosfato (Schlafli et al., 2011).

En un modelo hipotético de activación de PASK, basado en estudios realizados en levaduras, el dominio PAS se uniría directamente e inhibiría la actividad catalítica del dominio quinasa. El dominio PAS podría obligar a la PASK a permanecer en estado inactivo hasta que a este dominio se uniera a un ligando

endógeno. La unión del ligando al dominio PAS podría entonces alterar su conformación e interrumpir la interacción con el dominio quinasa y de este modo desbloquear la actividad catalítica (Cardon and Rutter, 2012; Hao and Rutter, 2008; Kikani et al., 2010). Esta activación transitoria podría ser estabilizada a través de auto o trans-fosforilación en residuos de treonina. Sin embargo, se ha demostrado que la fosforilación de este residuo no juega un papel decisivo en la activación de la PASK, ya que se han identificado adaptaciones estructurales que estabilizan la conformación activa del dominio quinasa en ausencia de fosforilación. La conservación evolutiva de este residuo de treonina sugiere que podría ser importante para modular la actividad de esta quinasa (Cardon and Rutter, 2012; Kikani et al., 2010). La PASK es entonces susceptible de fosforilar diversos sustratos que pueden regular la utilización de energía (Fig. 12). Sin embargo, el mecanismo por el cual PASK detecta los distintos estados metabólicos celulares es desconocido, pero probablemente esté relacionado con interacciones en el dominio PAS del extremo N-terminal.

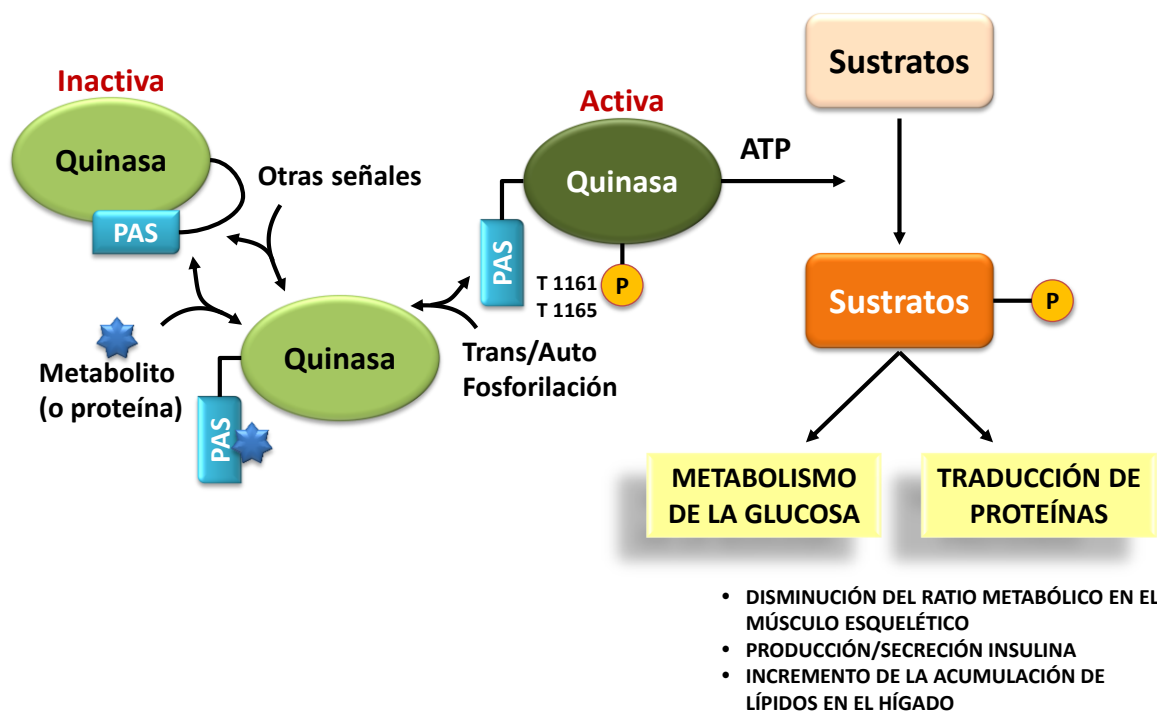


Figura 12. Hipotético modelo de señalización dependiente de PASK en mamíferos. Tras la unión de un ligando desconocido, la PASK se autofosforilaría, y como consecuencia de ello incrementaría la fosforilación de determinadas dianas implicadas en el metabolismo de la glucosa y en la traducción de proteínas. Adaptado de (Grose and Rutter, 2010).

Las propiedades reguladoras de la PASK podrían permitir a esta proteína detectar el estado metabólico de las células y provocar las respuestas metabólicas apropiadas (Cardon and Rutter, 2012).

3.4.2 *Sustratos celulares y funciones de la PASK*

➤ Relacionados con el metabolismo de la glucosa:

En levaduras se ha demostrado la participación de PASK en la regulación de la síntesis de glucógeno, observando que tanto la glucógeno sintasa (**GS**) como la UDP-glucosa pirofosforilasa (**Ugp-1**) son dianas de la PASK.

Ugp-1 es una proteína esencial que cataliza la síntesis de UDP-glucosa a partir de glucosa-1-fosfato y UTP. La UDP-glucosa, se utiliza como un donante de glucosa en variedad de procesos celulares que van desde la biosíntesis de glucógeno y glucanos de la pared celular a la glicosilación de las proteínas. Sorprendentemente, la fosforilación de Ugp-1 dependiente de PASK no altera su actividad enzimática, pero altera el destino final de su producto, lo que favorece la biosíntesis de glucanos de la pared celular a expensas de la biosíntesis de glucógeno. Este efecto se produce probablemente a través de relocalización de Ugp-1 citoplásmica a la periferia de la célula donde puede interactuar con las enzimas biosintéticas de la pared celular (Cardon and Rutter, 2012; Grose and Rutter, 2010; Hao and Rutter, 2008). No obstante, en mamíferos no se han encontrado sitios de fosforilación de PASK en Ugp-1.

La PASK es también un importante regulador de la GS y esta función parece haber sido conservada a lo largo de la evolución. La síntesis de glucógeno está catalizada por la GS, que está regulada por fosforilación en múltiples sitios. Así, la PASK fosforila el residuo de Ser 640 de la GS en humanos, inactivándola. Para que la fosforilación sea eficiente se requiere la interacción de la GS con el dominio PAS. La regulación de esta interacción está modulada por el estado metabólico, lo que proporciona a la célula la capacidad de decidir si utilizar o almacenar la energía disponible. La desregulación de este metabolismo puede desencadenar enfermedades como la diabetes de tipo 2 (Grose and Rutter, 2010).

Además, la PASK regula la **GSK3 β** , que fosforila e inhibe la GS, y modula la actividad de la fosfatasa PTEN. En células β -pancreáticas PASK fosforila la Ser 9 de GSK3 β inactivándola (Semache et al., 2013).

➤ Relacionados con la traducción de proteínas:

Se han identificado en levaduras tres sustratos de la PASK involucrados en la traducción de proteínas: factor eucariótico de elongación traduccional (**eEF1- α 1**), el factor de asociación a la estructura denominada caperuza o CAP que protege el extremo 5' de los ARN mensajeros (Caf20), una fosfoproteína que regula negativamente la traducción de proteínas y Sro9 una proteína citoplasmática de función desconocida que se asocia con los ribosomas durante la traducción (Grose and Rutter, 2010). Otra diana de la PASK es la uridina citidina quinasa 2 (Uck2).

El factor eEF1- α 1 humano parece ser también un sustrato de la PASK. Se ha publicado que PASK fosforila el residuo de Thr 432 de este factor incrementando la eficiencia de la traducción de proteínas, tanto en células somáticas como en células germinales, y se han identificado compartimentos subcelulares que muestran co-localización de eEF1- α 1 con PASK. Además de la PASK, existen otras proteínas quinasas que fosforilan a eEF1- α 1, como es la S6K1. La estimulación de la síntesis de proteínas en respuesta a insulina implica la fosforilación de eEF1- α 1 dependiente de S6K1. Por ello, la fosforilación de eEF1- α 1 dependiente de PASK podría vincular el metabolismo energético con la traducción de proteínas, como se ha demostrado en levaduras. Además, eEF1- α 1 muestra multitud de funciones no relacionadas con la síntesis de proteínas, como la organización del citoesqueleto, la transducción de señales, la síntesis de ARN, degradación de proteínas dañadas vía ubiquitinación-proteasoma, apoptosis...por lo que dicho factor está implicado en enfermedades importantes tales como la diabetes y el cáncer.

La PASK humana fosforila y activa proteínas ribosomales implicadas en la traducción de proteínas demostrando que esta quinasa vincula el metabolismo energético con la síntesis de proteínas. La **S6** es también diana de la PASK, además de ser sustrato de la S6K1, como mencionamos previamente. Estudios *in vitro* han demostrado que PASK fosforila a la S6 en los residuos Ser 235/236 (mismo sitio de fosforilación que la S6K1). Estos datos han sido también confirmados *in vivo* e incluso podría contribuir parcialmente a la fosforilación de S6 en las células deficientes en S6K1. Además de la S6, se ha observado que existen otras proteínas ribosomales que son sustrato de PASK, así como aminoacil-ARNt sintetetas (AlaRS) y factores de transcripción (BTF3, *Basic Transcription Factor 3*) que son requeridos para la iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II (Grose and Rutter, 2010).

3.4.3 Papel de la PASK como sensor de glucosa

La PASK es un importante sensor metabólico en las células de mamíferos y juega un papel importante en la regulación de genes involucrados en el mantenimiento del fenotipo diferenciado de las células β -pancreáticas. La PASK es rápidamente activada por alta glucosa en cultivo de células β -pancreáticas de ratón. Esta activación está seguida por un incremento tanto del ARNm como de la proteína independientemente de la concentración de insulina (Grose and Rutter, 2010).

La función principal de las células β -pancreáticas es sintetizar y secretar insulina en respuesta a elevados niveles de glucosa. Además de la liberación de insulina, la alta glucosa estimula la transcripción del gen de la pre-proinsulina. Se ha observado que la sobreexpresión de PASK imita el efecto de la alta glucosa e induce la expresión de la pre-proinsulina, incluso cuando la concentración de glucosa es baja, mientras que la deficiencia de PASK suprime la inducción de este gen (Grose and Rutter, 2010).

El incremento de la actividad de PASK parece inducir la transcripción del factor **PDX-1** (*Pancreatic and Duodenal Homeobox-1*), lo que conduce a la transcripción del gen de la pre-proinsulina. El factor de transcripción PDX-1 es necesario para el desarrollo normal del páncreas y para la producción de insulina por las células β -pancreáticas en mamíferos. Se ha demostrado que la glucosa regula la expresión del gen de insulina, en parte, a través de la activación y translocación del PDX-1 desde la periferia nuclear hacia el nucleoplasma, hecho que podría estar relacionado con la fosforilación de este factor por PASK. *In vitro*, esta fosforilación tiene lugar en el residuo Thr 152 de PDX 1 (Grose and Rutter, 2010). Sin embargo, hay controversia acerca de si la fosforilación de PDX-1 por PASK provoca la translocación de este factor de transcripción de la periferia nuclear hacia el nucleoplasma ya que, por el contrario, otras investigaciones apuntan a que la fosforilación de PDX-1 por PASK parece conducir al PDX-1 fuera del núcleo (An et al., 2006).

Existen datos que indican que los ácidos grasos deterioran la expresión del gen de insulina en respuesta a la glucosa. Estos fenómenos conocidos como glucolipotoxicidad podrían ser la base del fallo funcional de la célula β -pancreática observada en la diabetes tipo 2 (Poitout and Robertson, 2008). Del mismo modo, el

aumento de la expresión de PASK inducido por glucosa es inhibido por el palmitato. Curiosamente la sobreexpresión de PASK mitiga los efectos del palmitato en la expresión del PDX-1 y de la pre-proinsulina inducida por la glucosa (Fontes et al., 2009). Estas observaciones plantean la posibilidad de que la PASK sea un mediador clave de los efectos de la glucosa y los ácidos grasos en la expresión de insulina en las células β -pancreáticas.

PASK puede, asimismo, funcionar como un sensor metabólico en las células α -pancreáticas y se ha propuesto un modelo mediante el cual PASK podría estar involucrada en la regulación de la secreción de glucagón en estas células a través de la regulación de la expresión génica de la AMPK y/o a través de una vía no identificada. La secreción de glucagón está regulada por cambios en la glucosa extracelular y otros factores, incluyendo la insulina y otras moléculas liberadas por las células β -pancreáticas. PASK podría regular también la secreción de glucagón a través de su acción tanto en la función como en la masa de las células β -pancreáticas (da Silva Xavier et al., 2011). Por otro lado, se ha observado que la PASK actúa como un regulador de la secreción de glucagón por glucosa y podría ser utilizada como una diana útil para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (da Silva Xavier et al., 2011).

Además del papel como regulador de la secreción de insulina y glucagón, PASK parece actuar en los tejidos periféricos de ratones regulando la homeostasis de la glucosa. Se ha descrito que los ratones deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) son viables y no muestran defectos reproductivos ni en el desarrollo, y en ellos no se aprecian alteraciones en los niveles de glucosa en sangre, ni la tolerancia a la misma (Bortner et al., 2007; Katschinski et al., 2003). Paralelamente, otros estudios indican que la secreción de insulina en respuesta a glucosa está ligeramente disminuida en ratones *Pask*^{-/-}, aunque no presentan alteraciones en la tolerancia a la glucosa o en la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, los ratones deficientes en PASK están protegidos frente a la obesidad y a la resistencia a la acción de la insulina provocada por las dietas ricas en grasas. Se ha observado también que los efectos de la PASK son específicos de tejido y, por ejemplo, en el hígado la estimulación de PASK aumenta la síntesis y almacenamiento de triglicéridos, mientras que en el músculo esquelético disminuye la oxidación de ácidos grasos y el catabolismo de carbohidratos (Hao et al., 2007).

Los ratones deficientes en PASK poseen un fenotipo hipermetabólico que parece ser independiente del incremento de la biogénesis mitocondrial, puesto que la masa mitocondrial y la expresión de PGC1 α (un regulador de la biosíntesis mitocondrial) no se ven afectadas (Hao et al., 2007).

La supresión de la PASK produce una mejora de la tolerancia a la glucosa, un aumento de la sensibilidad a insulina, resistencia a la obesidad y menor acumulación de triglicéridos hepáticos. Esta protección es probablemente debida al mayor gasto energético y al incremento metabólico en el músculo incrementando el consumo de O₂ y la liberación de CO₂. Además, mioblastos deficientes en PASK presentan también una mayor oxidación de la glucosa y palmitato acompañada por una elevación de los niveles celulares de ATP (Hao et al., 2007; Hao and Rutter, 2008).

Las investigaciones con ratones en los que *Pask* es inactivado sugieren que, en ausencia de esta proteína quinasa, la señal de suficiencia de nutrientes no puede ser transducida, lo que conduce a una percepción errónea de depleción energética, que desencadena una elevación del metabolismo mitocondrial generando más energía (respuesta celular análoga observada tras la activación de la AMPK). Los fenotipos metabólicos de estos ratones son bastantes similares a los causados por la activación de AMPK o inhibición de mTOR/S6K, sin embargo, ni la activación de la AMPK, ni la inhibición de mTOR/S6K fue observada en tejidos de ratones deficientes en PASK, sugiriendo que las funciones de PASK son independientes de ambas quinasas. Como resultado, el ratio metabólico celular es elevado y la acumulación de lípidos, en el tejido adiposo y no adiposo, disminuye (Hao and Rutter, 2008).

Todos estos datos indican que la PASK puede controlar el estado energético celular actuando como un sensor, integrador y transductor señales metabólicas, y al igual que otros sensores metabólicos, como la AMPK y mTOR, puede ser una diana farmacológica, no sólo para la obesidad y la diabetes, cuyas evidencias ya existen, sino también para algunos tipos de cáncer.

4 GLP-1 Y SU IMPLICACIÓN EN LA INGESTA

4.1 Familia de los péptidos semejantes al glucagón. Estructura y procesamiento del proglucagón

El glucagón y péptidos relacionados constituyen una familia derivada de la molécula del proglucagón, cuya secuencia es idéntica en páncreas, intestino y cerebro, aunque el procesamiento post-traducciona del precursor da lugar a diferentes productos en estos órganos.

La distribución del gen del proglucagón incluye las células L del tracto intestinal, con una elevada densidad en íleon y colon, las células alfa del páncreas endocrino y algunas neuronas del hipotálamo y del tronco cerebral. Mientras en las células α -pancreáticas el proglucagón se escinde dando lugar al glucagón, en las células L del intestino y en cerebro la porción C-terminal del proglucagón se procesa dando lugar predominantemente a los péptidos similares al glucagón 1 y 2 (GLP-1 y GLP-2). El procesamiento adicional de GLP-1 en estas células produce las formas amidadas y truncadas del péptido: GLP-1 (7-36) amida, GLP-1 (7-37) y el GLP-1 (1-36) amida, siendo las dos primeras las formas biológicamente activas. El GLP-1 (7-36) amida (que en adelante denominaremos como GLP-1) es la forma más abundante en humanos (Baggio and Drucker, 2007; Holst, 2007; Hurtado-Carneiro et al., 2013) (Fig. 13).

Los péptidos semejantes al glucagón presentan propiedades de hormonas, neurotransmisores o neuromoduladores y llevan a cabo una amplia variedad de funciones. Las formas truncadas del GLP-1 tienen una fuerte actividad incretina, además de importantes funciones en otros tejidos periféricos y del sistema nervioso central. Ambas formas del péptido se distinguen por su capacidad de producir efectos biológicos a través de receptores de GLP-1 situados en las células pancreáticas, glándulas gástricas, adipocitos, pulmones y en cerebro. De hecho, el receptor de GLP-1 ha sido identificado en regiones cerebrales implicadas en la regulación de la ingesta (Alvarez et al., 1996; Baggio and Drucker, 2007; Holst, 2007; Hurtado-Carneiro et al., 2013).

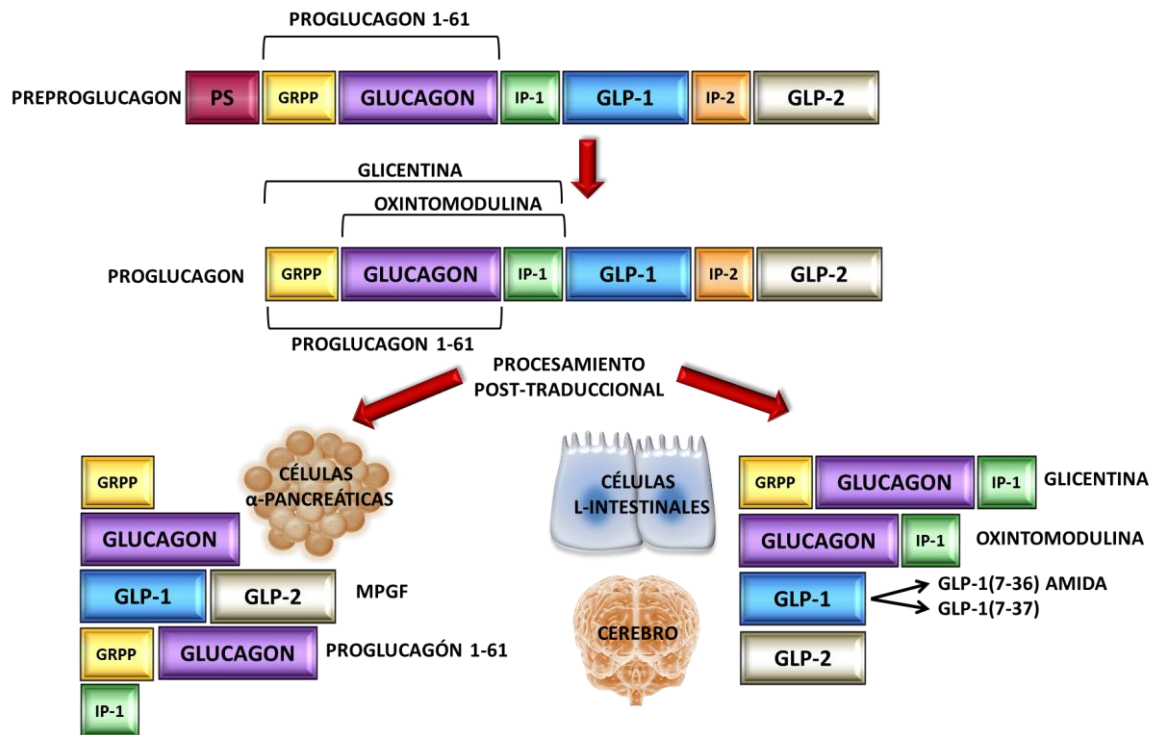


Figura 13. Expresión del gen del preproglucagón. GLP: péptido semejante al glucagón; GRPP: péptido pancreático relacionado con la glicentina; IP: péptido intermedio; MPGF: fragmento mayor del proglucagón; PS: péptido señal.

4.2 Secreción y metabolismo del GLP-1

Los niveles plasmáticos de GLP-1 son bajos en estado de ayuno, sin embargo, la ingesta de alimentos o la toma de glucosa por vía oral, aumenta la secreción de este péptido desde las células intestinales en cuestión de minutos.

El GLP-1 es secretado por las células L enteroendocrinas, la mayoría de las cuales están situadas en el íleon distal y colon. El estímulo principal para la secreción intestinal de GLP-1 es la ingestión de nutrientes, incluyendo la glucosa, los ácidos grasos y la fibra dietética. La liberación del GLP-1 se produce siguiendo un patrón bifásico, con un pico temprano seguido de una segunda fase más duradera, después de la ingestión de nutrientes (Baggio and Drucker, 2007; Janssen et al., 2013).

Es probable que la fase temprana de secreción de GLP-1 sea debida a la estimulación de las células L por diversos factores neurales y endocrinos, en contraste con la segunda o última fase, que puede ser causada por la estimulación directa de las células L intestinales por nutrientes. Después de la ingestión de

nutrientes, los niveles de GLP-1 en plasma aumentan de 2 a 5 veces, dependiendo del tamaño y la composición de la comida. Los péptidos difunden a través de la lámina subepitelial del intestino para entrar en la circulación y/o activar los nervios aferentes, por lo que pueden actuar como hormonas endocrinas o como agentes paracrinós (Janssen et al., 2013).

Después de su liberación, el GLP-1 es degradado rápidamente por la enzima proteolítica dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), de expresión ubicua, lo que resulta en la generación de las formas biológicamente inactivas del péptido: GLP-1 (9-36) amida o GLP-1 (9-37) (Janssen et al., 2013). El GLP-1 es muy susceptible a la degradación a través de la DPP-4 y, por ello, presenta una vida media muy corta (1-2 min). Una vez en el plasma, el riñón proporciona la vía principal de eliminación del péptido (Janssen et al., 2013).

El GLP-1 (en su forma truncada y amidada) es uno de los agentes más potentes capaces de provocar la secreción de insulina dependiente de glucosa.

4.3 Mecanismo de acción y efectos fisiológicos del GLP-1

El GLP-1 presenta múltiples funciones biológicas que afectan a los tejidos periféricos y al sistema nervioso central. Una de las más importantes es su actividad como hormona incretina, ya que regula los niveles de glucosa en sangre estimulando la síntesis y secreción de insulina dependiente de glucosa en las células β -pancreáticas y de somatostatina en las células δ , a la vez que reduce la de glucagón en las células α . Estas acciones contribuyen a la disminución de la producción de la glucosa hepática. Dentro de las múltiples funciones de GLP-1, cabe destacar también su acción anorexigénica, es decir, estimula la saciedad, mientras que también reduce el metabolismo cerebral de la glucosa en el hipotálamo y el tronco del encéfalo humano (Alvarez et al., 2005; Baggio and Drucker, 2007; Janssen et al., 2013) (Fig. 14).

4.3.1 Mecanismo de acción del GLP-1

El GLP-1 actúa a través de la unión a receptores acoplados a proteínas G, que como se ha mencionado previamente son expresados en las células alfa y beta del páncreas, riñón, pulmón, corazón, tracto gastrointestinal y varias regiones del sistema nervioso.

El mecanismo de transducción de señales originado a través de este receptor ha sido estudiado en detalle en la célula β -pancreática, donde la estimulación del receptor del GLP-1 conlleva un aumento de la secreción de la insulina. Así, la unión del GLP-1 a su receptor provoca la activación de la adenilato ciclasa (AC) mediante la activación de las proteínas G_{α_s} . El aumento de AMPc así originado, activa la PKA y promueve la fosforilación de varios componentes implicados en el metabolismo de la glucosa y en la regulación de los canales de potasio dependientes de ATP. Todo ello, junto con el aumento del ATP producido en la glucólisis subsiguiente a la entrada de glucosa, favorece el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP permitiendo así una despolarización de la célula β y la apertura de los canales de calcio. El aumento del calcio intracelular incrementa los fenómenos de exocitosis de los gránulos de insulina (Fig. 14). Además, la PKA está implicada en la expresión génica de la insulina mediada por PDX-1 (Doyle and Egan, 2007).

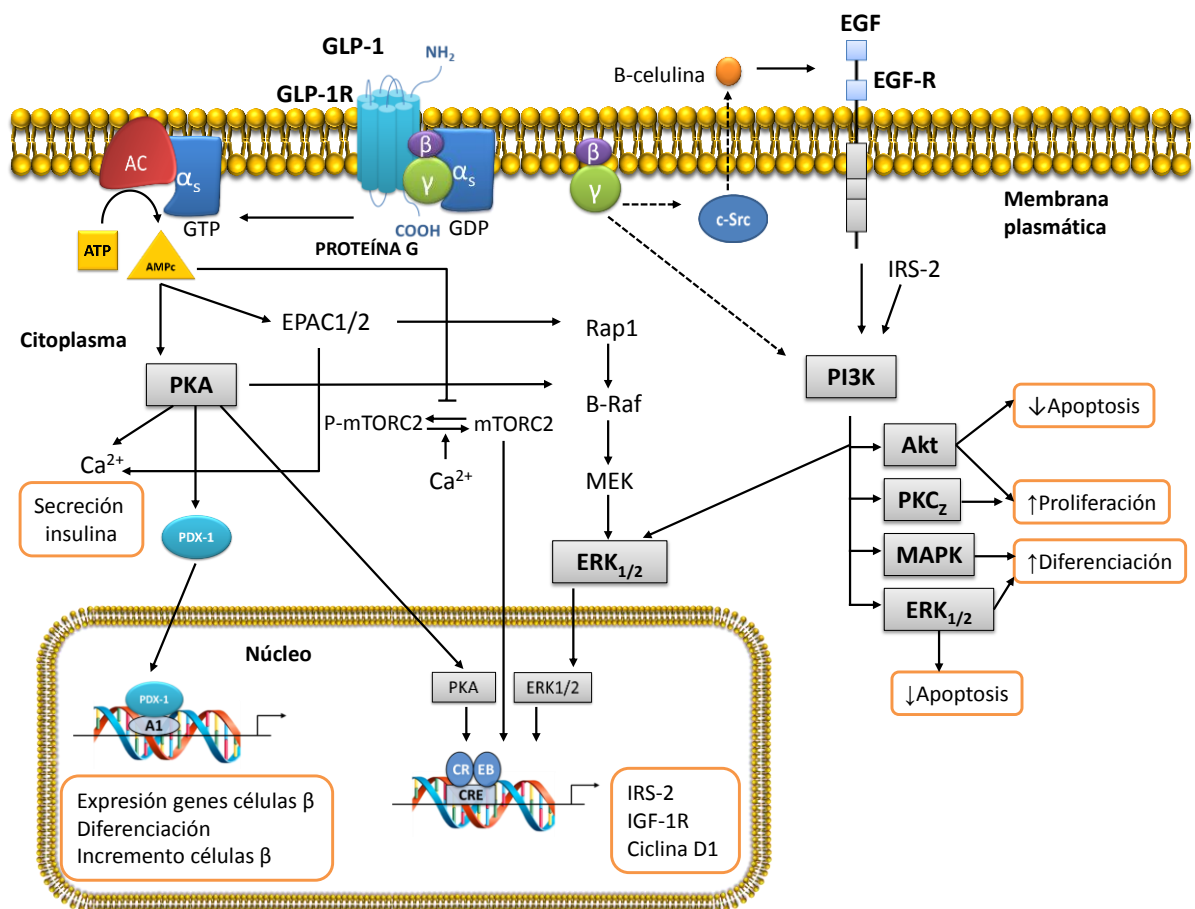


Figura 14. Esquema representativo del mecanismo de acción del GLP-1 en la célula β -pancreática. Adaptado de (Doyle and Egan, 2007).

Existen otras vías de señalización iniciadas por el receptor de GLP-1 que serían independientes de la PKA. Un ejemplo es aquella en la que intervendrían los factores de intercambio de nucleótidos guanina regulados por AMPc (GEFs), en concreto EPAC2 (Fig. 14). Otra es la originada por activación de la PI3K mediante dos posibles mecanismos: la unión del GLP-1 a su receptor provocaría que la subunidad $G\beta\gamma$ de la proteína G interactúe con PI3K activándola, y por otro lado, la activación de c-Src seguida de la liberación del factor de crecimiento epidérmico endógeno (EGF), activaría el receptor de EGF (EGF-R) y éste a su vez a PI3K. La activación de PI3K conduciría a la señalización de las vías MAPK, PKC ζ y Akt. En las células β -pancreáticas la activación de MAPK y PKC está asociada con la proliferación, mientras que la activación de MAPK conduce a la diferenciación de células β . La estimulación de la Akt protege a las células β -pancreáticas contra la apoptosis (Fig. 14).

Por otro lado, el efecto anti-apoptótico del GLP-1 está mediado por la activación de CREB (proteína de unión a los elementos de respuesta a AMPc) a través de la fosforilación mediada por PKA y su interacción con mTORC2. Una vez que CREB se encuentra activado, estimula la expresión génica, por ejemplo, del IRS-2, que a su vez está implicado en la activación de la vía de Akt (Doyle and Egan, 2007) (Fig. 14).

4.3.2 Efectos del GLP-1 en el tracto gastrointestinal

El GLP-1 tiene efectos sobre la secreción y motilidad gastrointestinal. Este péptido enlentece el vaciamiento gástrico (tanto en individuos obesos como en individuos sanos), reduce la motilidad gástrica y del íleon e inhibe la secreción del ácido gástrico. El mecanismo por el cual el GLP-1 media la inhibición del vaciamiento gástrico y la motilidad intestinal no está completamente claro, pero probablemente involucra la activación del nervio vago y acciones directas sobre la pared estomacal (Fig. 15).

El GLP-1 regula la capacidad gástrica. En individuos sanos, la administración periférica de GLP-1 incrementa de una manera dosis dependiente una relajación de la zona proximal de estómago con una consiguiente reducción de la sensación de hambre. Esto podría indicar que el GLP-1 puede reducir la ingesta independientemente de las acciones en el SNC.

Las acciones directas periféricas podrían ser incluso más importantes que las mencionadas anteriormente. Determinados estudios han demostrado la expresión del GLP-1R en neuronas entéricas, algunas de las cuales co-expresan óxido nítrico sintasa o acetilcolina transferasa, de forma que el efecto inhibitorio del GLP-1 en la motilidad del tracto gastrointestinal parece estar mediado por NO liberado de neuronas entéricas (Baggio and Drucker, 2007; Janssen et al., 2013).

4.3.3 Efectos del GLP-1 en el páncreas

El efecto “incretina” se define como el fenómeno en donde la respuesta de secreción de insulina a una sobrecarga oral de glucosa es mayor a la obtenida después de la perfusión intravenosa con igual cantidad de glucosa. Se acepta que de un 20% a un 60% del aumento en la secreción de insulina postprandial es debido a este efecto, dependiendo de la cantidad y la composición de los alimentos ingeridos.

Existen dos hormonas peptídicas llamadas incretinas responsables de dicho efecto: el GIP y el GLP-1. El GLP-1, secretado por las células L (localizadas en la porción del íleon y colon) y el GIP sintetizado en las células K del duodeno y yeyuno proximal. Ambos se liberan después de cargas orales de glucosa e incrementan la secreción de insulina en las células β -pancreáticas como respuesta a esta elevación de glucosa (Fig. 14).

El conocimiento de las incretinas ha sido muy útil para mejorar la comprensión de determinados procesos fisiopatológicos. En 1986 Nauck y cols. (Nauck et al., 1986) documentaron un efecto incretina reducido del GIP en pacientes con diabetes tipo 2. Un año más tarde, el GLP-1 fue identificado como hormona incretina (Kreymann et al., 1987) y se comprobó, tanto en pacientes diabéticos como en pacientes no diabéticos, que es más eficaz que el GIP en la mejora de la secreción de insulina y en la disminución de las concentraciones de glucagón. Además, como indicamos previamente, el GLP-1 estimula la transcripción del gen de la proinsulina y la biosíntesis de insulina, inhibe la secreción de glucagón y estimula la de somatostatina (Baggio and Drucker, 2007; Hurtado-Carneiro et al., 2013; Reusch and Padrutt, 2013) (Fig. 15).

Las funciones del GLP-1 después de su liberación están limitadas por su corta vida media, ya que es metabolizado rápidamente por la enzima DPP-4. Para

evitar su degradación se han desarrollado agonistas del GLP-1 resistentes a esta enzima e inhibidores de la misma (Baggio and Drucker, 2007). Ambos presentan una actividad biológica más prolongada por su mayor estabilidad *in vivo* y pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la regulación de la glucosa (Pospisilik et al., 2002) (Fig. 15).

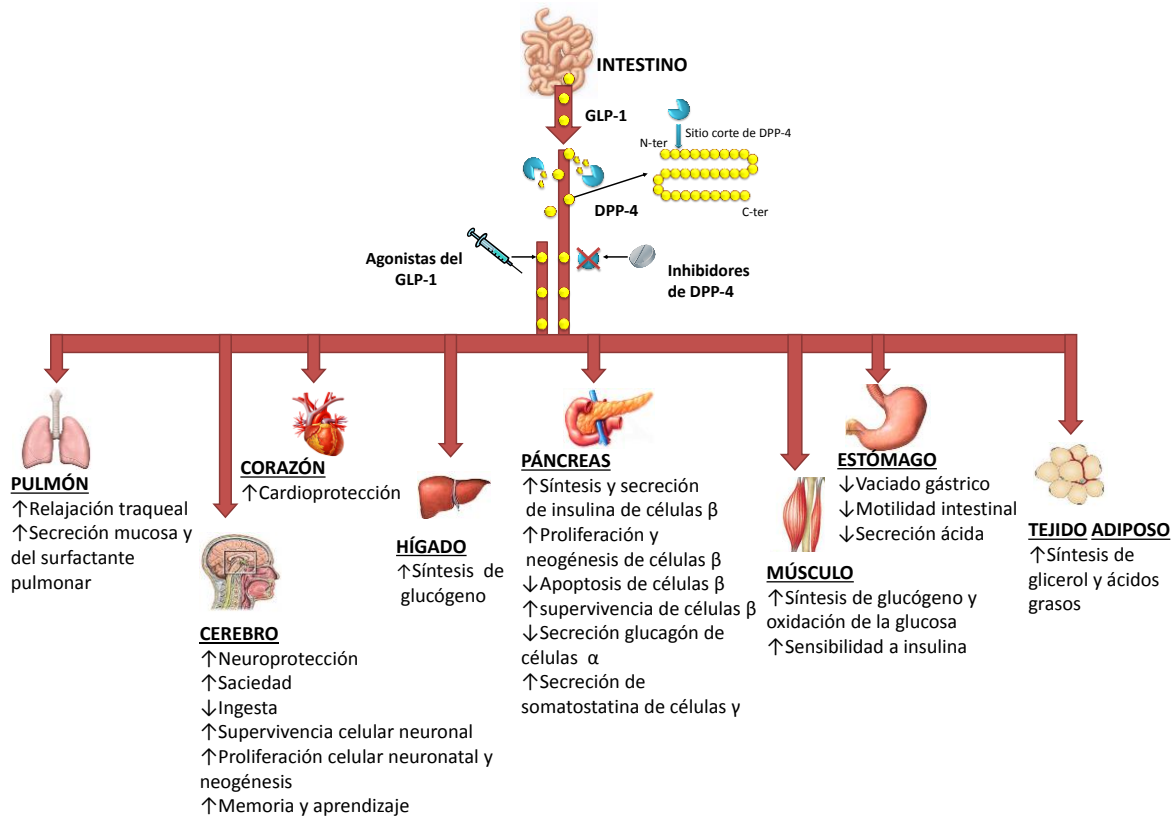


Figura 15. Esquema representativo de los efectos del GLP-1 en tejidos periféricos y en el SNC. Adaptado de (Reusch and Padrutt, 2013).

El GLP-1 es también capaz de incrementar el número de células β-pancreáticas, bien por la mejora en la proliferación, por inhibición de la apoptosis o por estimulación de la diferenciación de las células madre en el epitelio ductal. En modelos experimentales de diabetes, el GLP-1 incrementa la masa de células β-pancreáticas, aumenta la resistencia a las lesiones en estas células y reduce los niveles elevados de glucosa en ayunas y en estado de alimentación. Estos efectos, junto con el control de la distribución sistémica de glucosa durante la hiperglucemia (aumentando de este modo el almacenamiento de glucógeno

hepático), han hecho que el GLP-1 sea considerado como un potente agente antidiabetogénico (Baggio and Drucker, 2007; Janssen et al., 2013).

Otros efectos del GLP-1 se encuentran resumidos en la Figura 15. Entre ellos destacan sus funciones: i) cardio- y neuroprotectora, ii) reguladora de la secreción del surfactante pulmonar y iii) a nivel hepático, muscular y del tejido adiposo (Barragan et al., 1999; Chowen et al., 1999; Salcedo et al., 2012; Valverde et al., 2002; Vara et al., 2001).

4.4 Papel del GLP-1 en el control de la ingesta

Se han encontrado en el cerebro de mamíferos determinadas hormonas peptídicas, consideradas en principio específicas del sistema gastro-entero-pancreático, que están encargadas de modular el apetito, la homeostasis energética y el peso corporal. Así, el GLP-1 y sus receptores son sintetizados en las mismas áreas del cerebro, especialmente en el hipotálamo y en determinadas áreas del tronco cerebral, reafirmando las acciones de este péptido en el SNC (Calvo et al., 1995b; Goke et al., 1995; Kanse et al., 1988; Shimizu et al., 1987; Uttenthal et al., 1992). Además, los receptores de GLP-1 se co-expresan con glucoquinasa y GLUT-2 (componentes del sistema sensor de glucosa) en las neuronas involucradas en el control de la ingesta de alimentos. Esto sugiere, que al igual que en las células β -pancreáticas, los GLP-1R pueden desempeñar un papel en el mecanismo sensor de glucosa cerebral (Alvarez et al., 2005; Alvarez et al., 1996; Alvarez et al., 2002; Navarro et al., 1996; Roncero et al., 2004; Roncero et al., 2000).

El GLP-1 es considerado un péptido anorexigénico. La perfusión de varios núcleos del cerebro con GLP-1 produce una liberación selectiva de neurotransmisores (Calvo et al., 1995a; Mora et al., 1992). A su vez, el GLP-1 regula también la captación de glucosa en el cerebro humano, ya que estudios realizados mediante tomografía de emisión de positrones (PET) indican que el tratamiento con GLP-1 reduce el metabolismo cerebral de glucosa en el hipotálamo y tronco del encéfalo (Alvarez et al., 2005). En modelos animales, la administración icv o periférica de GLP-1 inhibe la ingesta de alimentos y agua (Blazquez et al., 1998; Goke et al., 1995; Navarro et al., 1996; Rodriguez de Fonseca et al., 2000; Tang-Christensen et al., 1996; Turton et al., 1996).

Multitud de estudios realizados en humanos, reflejan también que el GLP-1 modula la ingesta de alimentos y agua mediante mecanismos centrales y

periféricos (Gutzwiller et al., 1999). Así, la administración periférica de este péptido a humanos produce los mismos efectos que aquellos observados en animales de experimentación. De hecho, el GLP-1 después de su administración subcutánea puede penetrar en el cerebro mediante la unión a sus receptores en estructuras libres de la barrera hematoencefálica tales como el órgano subfornical y el área postrema (Orskov et al., 1996). Por otra parte, también puede ser transportado al interior del cerebro a través del plexo coroideo, el cual tiene una alta densidad de receptores de GLP-1 (Alvarez et al., 1996; Navarro et al., 1996). El problema de la utilización de GLP-1 es su corta vida media.

La comparación de los efectos de la exendina-4 (análogo estructural del GLP-1 más estable) a nivel central y periférico en ratas obesas y sus controles delgadas confirman que tratamientos durante un largo periodo de tiempo disminuyen la ingesta diaria de alimentos y bloquean la ganancia de peso en estos animales (Rodríguez de Fonseca et al., 2000). Además, la exendina-4, al igual que el GLP-1, facilita la disminución de la glucosa en sangre de pacientes con diabetes tipo 2 (Gutniak et al., 1992; Holst, 1994; Kreymann et al., 1987; Schjoldager et al., 1989), poniendo de manifiesto la utilidad de la exendina-4 como herramienta para el tratamiento de la obesidad y/o diabetes (Gutzwiller et al., 2006).

El efecto del GLP-1/exendina-4 sobre la ingesta y la toma de fluidos observada en individuos normales puede ser beneficioso y extrapolable a individuos con patologías, tales como la obesidad y diabetes tipo 2. A la luz de estos resultados, se han desarrollado recientemente diferentes análogos del GLP-1 resistentes a DPP-4, los cuales presentan una actividad biológica más prolongada por su mayor estabilidad *in vivo*, lo que es de gran interés en el tratamiento de estas patologías (Flint et al., 1998; Gutzwiller et al., 1999; Gutzwiller et al., 2004; Naslund et al., 1998; Verdich et al., 2001).

4.5 GLP-1 y sus implicaciones en obesidad y diabetes.

El principal interés clínico en GLP-1 se centra en el desarrollo de tratamientos para patologías entre las que mencionaremos la obesidad y la diabetes tipo 2.

Los hipoglucemiantes orales y la insulina que se utilizan para el tratamiento de la diabetes tipo 2 no consiguen detener o disminuir el deterioro de la función de las células β -pancreáticas. No obstante, se considera que los tratamientos con GLP-

1 o sus análogos mejoran la función β -pancreática. Esto puede ser debido a que el GLP-1, a diferencia de otros hipoglucemiantes, ejerce acciones adicionales: i) sobre las células β -pancreáticas mejora la proliferación e inhibe la apoptosis, ii) reduce la secreción de glucagón, iii) favorece el enlentecimiento del vaciamiento gástrico y iv) disminuye el apetito. Por todo ello, los pacientes diabéticos tratados con GLP-1 necesitan menos insulina exógena y tienen una hiperglucemia postprandial reducida.

Uno de los abordajes que actualmente se llevan a cabo para tratar la obesidad mórbida es la cirugía de reducción de estómago y bypass gástrico. Interesantemente, el papel del GLP-1 puede potenciar los efectos beneficiosos observados después de estas intervenciones. Tras la cirugía, la secreción de GLP-1 es muy elevada resultando en la reducción del apetito y de la ingesta de alimentos y, por lo tanto, facilita la pérdida de peso. Por otro lado, este tipo de operaciones también causan una mejora dramática en la tolerancia a la glucosa inmediatamente después de la intervención, antes incluso de que se produzca una importante pérdida de peso (Holst, 2007).

Los estados de sobrepeso y de obesidad están frecuentemente relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina caracterizada por hiperglucemia, una menor captación de glucosa dependiente de insulina y un incremento de los niveles de ácidos grasos libres. Se ha observado que la secreción de GLP-1 se encuentra disminuida en individuos obesos. Sin embargo, el mecanismo por el cual esto sucede no se conoce. Se plantea que, en particular, la capacidad de respuesta de las células L (secretoras de GLP-1) a los hidratos de carbono puede estar afectada, y los niveles de ácidos grasos circulantes podrían también jugar un papel en esta respuesta. No obstante, otros estudios indican que los niveles de ácidos grasos libres no parecen intervenir en este proceso. Los datos conjuntos sugieren que la disminución de la secreción de GLP-1 en la obesidad se desarrolla secundariamente al aumento de peso (Holst, 2007). En concordancia con esto, la diabetes tipo 2 se caracteriza también por la secreción inadecuada de la insulina como consecuencia de una actividad incretina disminuida.

Se han formulado principalmente dos estrategias para aumentar el efecto de las incretinas:

➤ **Los estimuladores de las incretinas** o “incretinomiméticos”. Son agentes inyectables que semejan los efectos de GLP-1 sobre el control de la glucosa. Estos estimuladores son péptidos sintéticos similares al GLP-1 (análogos del GLP-1), modificados para hacerlos resistentes a la acción de la DPP-4 y que activan el receptor del GLP-1. Entre los miméticos del GLP-1 destaca la liraglutida y la exenatida, que están disponibles comercialmente y se usan en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Janssen et al., 2013; Reusch and Padrutt, 2013). En la práctica clínica, los análogos del GLP-1 son administrados diariamente en el tratamiento de la diabetes tipo 2 ya que mejoran la glucemia, reducen los niveles de hemoglobina A1c y mejoran la función β -celular. Además, los pacientes experimentan una pérdida de peso progresiva y dependiente de la dosis y una disminución de la presión sanguínea (Reusch and Padrutt, 2013).

➤ **Los potenciadores de incretinas** (inhibidores de la DPP-4). Son agentes de bajo peso molecular activos por vía oral que, al inhibir la DPP-4, aumentan los niveles de incretinas endógenas. Inhibidores de la DPP-4 son la vildagliptina, sitagliptina, linagliptida y saxagliptina. En combinación con otras drogas antidiabetogénicas mejoran aún más el control glucémico, aunque también son efectivas en monoterapia, sin embargo, su efecto es inferior al producido por los agonistas de GLP-1. A diferencia de los incretinomiméticos no parecen ser beneficiosos en el control de la presión sanguínea, ni reducen el peso corporal (Reusch and Padrutt, 2013).

Las desventajas de la utilización clínica de estos agentes antidiabetogénicos están asociadas, en algunos casos, con efectos secundarios perjudiciales. No obstante, en la actualidad se están diseñando y desarrollando clínicamente varios agonistas del receptor de GLP-1 que permitirían su suministro una vez por semana y evitarían los efectos adversos.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral fue estudiar la respuesta de determinados sensores metabólicos (AMPK, mTOR y PASK) en función de la disponibilidad fisiológica de nutrientes, así como el papel regulador del péptido anorexigénico GLP-1 sobre dichos sensores, focalizando nuestro estudio en las áreas hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta (VMH y LH). Asimismo, se examinaron las posibles alteraciones en la regulación de estos sensores causadas por estados fisiopatológicos como la obesidad o la diabetes, y se valoró si la deficiencia de PASK alteraba el mecanismo sensor de nutrientes.

Para alcanzar los diferentes objetivos se han utilizado distintos abordajes experimentales. Algunos estudios fueron realizados utilizando líneas celulares hipotalámicas (GT1-7) y derivadas de neuroblastoma (N2A). Paralelamente, se llevaron a cabo aproximaciones más fisiológicas mediante cultivos organotípicos de rodajas hipotalámicas de ratas Wistar. Finalmente, los estudios fueron completados mediante ensayos *in vivo* realizados en ratas Zucker obesas y controles delgadas o bien en ratones C57Bl/6 silvestres o deficientes en PASK.

En concreto, los objetivos propuestos fueron:

1. Estudiar la regulación por glucosa y GLP-1 de la actividad y expresión de AMPK y mTOR/S6K1, así como de algunas proteínas intermediarias de las vías de activación/inhibición de estas quinasas en líneas celulares hipotalámicas y/o de neuroblastoma. Y, complementariamente, discernir las rutas de señalización que median la activación/inhibición de esas vías.
2. Analizar el efecto del GLP-1 sobre la regulación de la expresión génica y sobre la actividad de la AMPK y PASK en las áreas VMH y LH de cultivos organotípicos sometidos a fluctuaciones en la concentración de glucosa.
3. Analizar, *in vivo*, el efecto del estado nutricional y los tratamientos con exendina-4 sobre las vías de señalización de AMPK y mTOR/S6K1 en las áreas hipotalámicas VMH y LH y su respuesta en situaciones fisiopatológicas, como la obesidad.
4. Analizar el efecto de la glucosa y del GLP-1 sobre la expresión de PASK y estudiar, mediante silenciamiento génico con ARN de interferencia, la

función de PASK en el mecanismo sensor de glucosa y su interrelación con otros sensores metabólicos, en concreto con las vías de AMPK y mTOR/S6K1.

5. Estudiar el efecto del estado nutricional (ayuno e ingesta) y de los tratamientos con exendina-4 sobre la PASK, en las áreas VMH y LH de ratones controles o deficientes en PASK, para poner de manifiesto la importancia de esta quinasa en el mecanismo sensor de nutrientes y analizar si su deficiencia modifica la respuesta de las vías AMPK y mTOR/S6K1 en estas áreas.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

La metodología empleada y los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se encuentran descritos y detallados ampliamente en las tres publicaciones que se enumeran y se adjuntan a continuación:

1. El péptido semejante al glucagón 1 (GLP-1) puede revertir las actividades de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) y de la quinasa de la proteína S6 ribosomal (P70S6K) inducidas por fluctuaciones en los niveles de glucosa en áreas hipotalámicas implicadas en el comportamiento alimentario. "*Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) can reverse AMP-activated protein kinase (AMPK) and S6 kinase (P70S6K) activities induced by fluctuations in glucose levels in hypothalamic areas involved in feeding behaviour*". V. Hurtado-Carneiro, C. Sanz, I. Roncero, E. Blázquez y E. Alvarez. *Mol Neurobiol* 45(2): 348-361 (2012). DOI 10.1007/s12035-012-8239-z.
2. La quinasa con dominios PAS es un sensor de nutrientes en células de neuroblastoma e hipotalámicas necesario para mantener la expresión y actividad normales de otros sensores celulares de nutrientes y de energía. "*PAS kinase as a nutrient sensor in neuroblastoma and hypothalamic cells required for the normal expression and activity of other cellular nutrient and energy sensors*". V. Hurtado-Carneiro, I. Roncero, E. Blázquez, E. Alvarez y C. Sanz. *Mol Neurobiol* 48(3): 904-920 (2013). DOI 10.1007/s12035-013-8476-9.
3. La quinasa con dominios PAS es un sensor de nutrientes y de energía en áreas hipotalámicas necesario para mantener la función normal de AMPK y mTOR/S6K1. "*PAS kinase is a nutrient and energy sensor in hypothalamic areas required for the normal function of AMPK and mTOR/S6K1*". V. Hurtado-Carneiro, I. Roncero, Sascha S. Egger, Roland H. Wenger, E. Blázquez, C. Sanz y E. Alvarez. *Mol Neurobiol* Aceptado 24/12/2013. DOI 10.1007/s12035-013-8630-4.

1 ARTICULO 1. EL PÉPTIDO SEMEJANTE AL GLUCAGÓN 1 (GLP-1) PUEDE REVERTIR LAS ACTIVIDADES DE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP (AMPK) Y DE LA QUINASA DE LA PROTEÍNA S6 RIBOSOMAL (P70S6K) INDUCIDAS POR FLUCTUACIONES EN LOS NIVELES DE GLUCOSA EN ÁREAS HIPOTALÁMICAS IMPLICADAS EN EL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO

[*Mol Neurobiol* 45(2): 348-361 (2012)]

RESUMEN

El péptido anorexigénico GLP-1 (péptido semejante al glucagón 1) reduce el metabolismo de la glucosa en el hipotálamo y tronco cerebral de humanos. La actividad cerebral de sensores metabólicos, tales como la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK), responde a cambios en los niveles de glucosa. La diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) y su sustrato, la quinasa de la proteína ribosomal S6 (p70S6K o S6K1), integran señales hormonales y de nutrientes, y la vía mTOR/S6K1 hipotalámica está implicada en el control de la ingesta y en la regulación del balance energético. Por todo ello, en este trabajo hemos analizado los efectos coordinados de la glucosa y del GLP-1 en la expresión y actividades de la AMPK y la S6K1 en áreas implicadas en el control de la alimentación. El efecto del GLP-1 en la expresión y actividades de estas quinasas se estudió en explantes de rodajas hipotalámicas expuestas a concentraciones altas y bajas de glucosa mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) y por la cuantificación de los niveles de proteína fosforilada, mediante inmunodetección. *In vivo*, los efectos de la exendina-4 en la activación de la AMPK y la S6K1 fueron analizados en ratas Zucker obesas y controles delgadas 1 h después de la inyección de este péptido a las ratas ayunadas durante 48 horas o re-alimentadas durante 2-4 horas después del ayuno. Observamos que niveles elevados de glucosa disminuían la expresión de la AMPK en el hipotálamo lateral (LH) y que el tratamiento con GLP-1 revertía dicho efecto. El tratamiento con GLP-1 inhibía las actividades de la AMPK y S6K1 cuando la activación de estas quinasas era máxima, tanto en el hipotálamo ventromedial (VMH) como en LH. Además, *in vivo*, la administración subcutánea de exendina-4 modulaba las actividades de la AMPK y S6K1 en esas áreas, tanto en ayunas como en condiciones de re-alimentación en ambos grupos de ratas.

Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) Can Reverse AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and S6 Kinase (P70S6K) Activities Induced by Fluctuations in Glucose Levels in Hypothalamic Areas Involved in Feeding Behaviour

Verónica Hurtado-Carneiro, Carmen Sanz, Isabel Roncero, Patricia Vazquez, Enrique Blazquez, et al.

Molecular Neurobiology

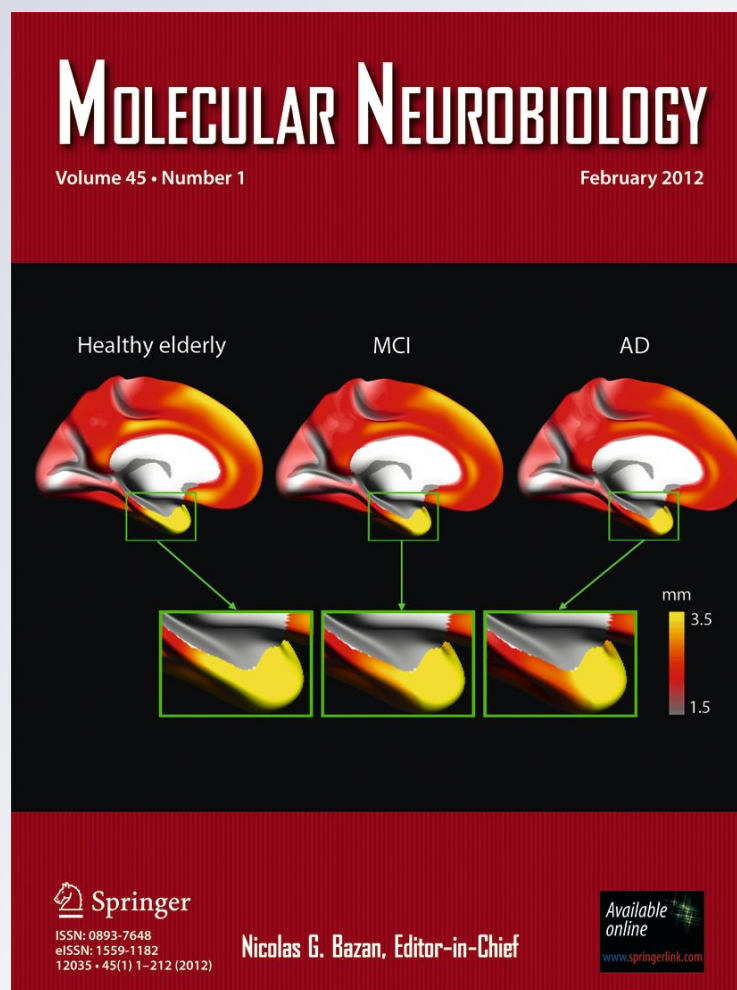
ISSN 0893-7648

Volume 45

Number 2

Mol Neurobiol (2012) 45:348-361

DOI 10.1007/s12035-012-8239-z



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) Can Reverse AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and S6 Kinase (P70S6K) Activities Induced by Fluctuations in Glucose Levels in Hypothalamic Areas Involved in Feeding Behaviour

Verónica Hurtado-Carneiro · Carmen Sanz ·
Isabel Roncero · Patricia Vazquez · Enrique Blazquez ·
Elvira Alvarez

Received: 2 December 2011 / Accepted: 13 January 2012 / Published online: 5 February 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract The anorexigenic peptide, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), reduces glucose metabolism in the human hypothalamus and brain stem. The brain activity of metabolic sensors such as AMP-activated protein kinase (AMPK) responds to changes in glucose levels. The mammalian target of rapamycin (mTOR) and its downstream target, p70S6 kinase (p70S6K), integrate nutrient and hormonal signals. The hypothalamic mTOR/p70S6K pathway has been implicated in the control

of feeding and the regulation of energy balances. Therefore, we investigated the coordinated effects of glucose and GLP-1 on the expression and activity of AMPK and p70S6K in the areas involved in the control of feeding. The effect of GLP-1 on the expression and activities of AMPK and p70S6K was studied in hypothalamic slice explants exposed to low- and high-glucose concentrations by quantitative real-time RT-PCR and by the quantification of active-phosphorylated protein levels by

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12035-012-8239-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. Hurtado-Carneiro · C. Sanz · I. Roncero · E. Blazquez ·
E. Alvarez
Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty
of Medicine, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital
Clínico San Carlos (IdISSC), Complutense University,
Ciudad Universitaria, sn,
28040 Madrid, Spain

V. Hurtado-Carneiro · C. Sanz · I. Roncero · P. Vazquez ·
E. Blazquez · E. Alvarez
The Center for Biomedical Research in Diabetes and Associated
Metabolic Disorders (CIBERDEM),
Barcelona, Spain
URL: www.ciberdem.org

C. Sanz
Department of Cell Biology, Faculty of Medicine,
Complutense University of Madrid,
Madrid, Spain

P. Vazquez
3D Lab (Development, Differentiation and Degeneration),
Department of Cellular and Molecular Medicine,
Centro de Investigaciones Biológicas,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
Madrid, Spain

E. Alvarez (✉)
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Medicina, Universidad Complutense,
Plaza S. Ramón y Cajal, s/n,
28040 Madrid, Spain
e-mail: eao513@med.ucm.es

immunoblot. In vivo, the effects of exendin-4 on hypothalamic AMPK and p70S6K activation were analysed in male obese Zucker and lean controls 1 h after exendin-4 injection to rats fasted for 48 h or after re-feeding for 2–4 h. High-glucose levels decreased the expression of *Ampk* in the lateral hypothalamus and treatment with GLP-1 reversed this effect. GLP-1 treatment inhibited the activities of AMPK and p70S6K when the activation of these protein kinases was maximum in both the ventromedial and lateral hypothalamic areas. Furthermore, in vivo s.c. administration of exendin-4 modulated AMPK and p70S6K activities in those areas, in both fasted and re-fed obese Zucker and lean control rats.

Keywords AMPK · Control of feeding · Antidiabetogenic agents · Hypothalamus · mTOR/S6K · Zucker rats

Introduction

AMPK functions as a cellular energy sensor and is activated during energy depletion. AMPK activation occurs through an increase in the AMP/ATP ratio and triggers large number of downstream targets by stimulating ATP-generating, catabolic pathways and inhibiting anabolic pathways [1, 2]. AMPK is a heterotrimeric serine/threonine kinase consisting of a catalytic α -subunit encoded by 2 genes ($\alpha 1$ or $\alpha 2$), a β -subunit encoded by 2 genes ($\beta 1$, $\beta 2$) and a regulatory γ -subunit encoded by 3 genes ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) [3]. The use of AMPK-knockout mice deficient in the catalytic subunit has shown that while AMPK $\alpha 1$ –/– mice have no metabolic alterations, AMPK $\alpha 2$ –/– mice show insulin resistance and no apparent changes in body weight or food intake [4–6].

Hypothalamic AMPK has been suggested to play a role in the central regulation of food intake and energy balance. Thus, fasting increases and re-feeding decreases AMPK activity in several hypothalamic nuclei [7]. Control of food intake is also modulated by several neuropeptides that may regulate feeding behaviour in animals and humans by stimulating (orexigenic peptides) or inhibiting (anorexigenic peptides) food intake to maintain energy homeostasis and body weight. Hypothalamic AMPK is also regulated by several orexigenic and anorexigenic signals [7–9]. In this sense, hypothalamic AMPK activity is inhibited by anorexigenic peptides such as leptin and specifically affects AMPK $\alpha 2$ activity [7–9].

The mammalian target of rapamycin (mTOR) and its downstream target, p70S6K, integrate nutrient and hormonal signals and regulate protein synthesis, cell growth and proliferation in peripheral organs. The hypothalamic mTOR/p70S6K pathway has been implicated in the control of feeding and the regulation of energy balances [10]. mTOR is activated by glucose and amino acids, causing an inhibition of food intake. Thus, hypothalamic AMPK and mTOR respond to

changes in glucose and other nutrients in the opposite sense, and their effects on the regulation of food intake may overlap. In peripheral organs, an overabundance of fuel alters the activity of metabolic sensors, leading to insulin resistance [11]. Deregulation of this signalling pathway in the hypothalamic centres involved in the control of feeding could be involved in the development of obesity and type 2 diabetes.

We have previously reported that GLP-1 is an anorexigenic peptide [12–16] that reduces cerebral glucose metabolism in human hypothalamus and brain stem [17]. Coexpression of the GLP-1 receptors, glucokinase and GLUT-2 in hypothalamic cells involved in feeding behaviour might play a role in glucose sensing [14, 18–20]. At least two kinds of glucose sensor neurons have been described in the brain. Glucose-excited neurons are mainly present in the ventromedial hypothalamus (VMH) and are excited by increased glucose levels in the extracellular space, with changes in their firing rates. In contrast, glucose-inhibited neurons, mainly present in the lateral hypothalamus (LH) area, are excited by decreases in glucose in the extracellular space. It has been previously suggested that AMPK plays a role in the glucose sensing effect of glucose-inhibited neurones [21]. Claret et al. have reported that specific removal of $\alpha 2$ AMPK in hypothalamic pro-opiomelanocortin neurones or in hypothalamic agouti-related peptide neurones modifies the response to extracellular glucose changes, suggesting a role for AMPK as a common glucose sensor in these neurones [22]. In light of the above experimental evidence, we studied the possible interactions between the actions of GLP-1 and the hypothalamic AMPK and mTOR/p70S6K pathway. GLP-1 was seen to be able to induce several effects contributing to the control of feeding behaviour. It inhibited gastric acid secretion and emptying, stimulated postprandial insulin secretion and inhibited glucagon release. GLP-1 treatment to type 2 diabetic subjects normalized the fasting levels of blood glucose and decreased glucose levels after ingestion of a meal. Furthermore, the GLP-1 receptor agonist exendin-4 is one of the oral hypoglycaemic agents used in clinical practice [23] and is a long-acting agonist that also produces weight loss [24–26]. The increased prevalence of type 2 diabetes and obesity in recent years points to the importance of developing therapies able to integrate glycaemic control and food intake. Besides GLP-1, AMPK has been proposed as another possible target for hypoglycaemic drugs. Thus, we investigated the effects of GLP-1 on the expression and activity of AMPK in the VMH and LH areas. We have previously reported a distinctive pattern of glucokinase activities between those areas [27] as well as a distinctive response to glucose extracellular levels and a different modulation by orexigenic and anorexigenic peptides [8, 28]. In addition, the effect of subcutaneous administration of exendin-4 on the activity of hypothalamic AMPK and p70S6K under starvation and re-feeding

conditions was analysed in the VMH and LH areas of obese male and lean control Zucker rats.

Materials and Methods

Experimental Animals

All procedures involving animals were approved by the appropriate Institutional Review Committee and met the guidelines for the care of animals specified by the European Community. Same-aged male Wistar rats weighing 200–250 g, lean normal Fa/fa Zucker rats weighing 250–350 g and obese male Zucker (fa/fa) weighing 400–550 g rats (Charles River Laboratories) were fed ad libitum with a standard pellet diet and housed at a constant temperature (21°C) on a 12-h light–dark cycle, with lights on at 08:00 A.M.

Cell Cultures

Mouse neuroblastoma N2A cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 (Sigma-Aldrich) containing 4.5 g/l glucose. The GT1-7 cell line (generously provided by P Mellon, Department of Reproductive Medicine, School of Medicine, University of California, San Diego, CA, USA) is an immortalized GnRH-secreting cell line created from mouse hypothalamic neurosecretory cells [29] and was maintained in DMEM (Sigma-Aldrich) containing 4.5 g/l glucose. The media were supplemented with 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml) and 10% foetal bovine serum (FBS). Cells were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Procedure for Hypothalamic Slice Explant Cultures

Hypothalamic slices were obtained as described previously [27]. Briefly, male Wistar rats were killed by decapitation, and the brains were quickly removed and immersed in cold (4°C) MEM medium containing 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid (HEPES), 20% heat-inactivated horse serum, 4 mM glutamine, 6.5 mg/ml glucose and 100 U/ml penicillin–streptomycin. The hypothalami were removed from the brain and sectioned at 300 µm thickness on a McIlwain tissue chopper (Mickle Laboratory Engineering, Surrey, UK). The slices were cultured at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ for 5 h in MEM supplemented with 25 mM HEPES and Hank's salt-enriched with the above components in order to stabilize the cultures. Then, the slices were incubated in medium containing 2% FBS and 5.5 mM glucose for 16 h. Following this, the hypothalamic slices were fasted at 0.5 mM glucose for 2 h. The medium was removed and the slices were

incubated for different times with either 0.5 or 10 mM glucose, in some cases adding 10 nM GLP-1 over the last 10 min. At the end of the incubations, special care was taken to identify and isolate (by micropunching) the VMH and LH areas according to the stereotaxic coordinates [30].

Zucker rats were fasted for 48 h. Some animals were re-fed for 2–4 h, and some of them were treated s.c. with Exendin-4 (250 ng/100 g body weight, Bachem) for 1 h. The hypothalami were removed from the brains and sectioned at 500 µm, and VMH and LH were isolated as described above and immediately lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris–HCl, pH 7.2, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.25 mM EDTA, pH 8.0, 10 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 2.5 mM sodium pyrophosphate) and a tablet of protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), after which they were exposed to microwave irradiation for 5 s.

Real-Time Polymerase Chain Reaction (TaqMan® Assay)

Total RNA from rat hypothalamic slices was extracted with TRIZOL (Life Technologies, Barcelona, Spain). The mRNA levels of *Ampk-α2* and *18s RNA* were measured by real-time quantitative RT-PCR using Taqman probes (Applied Biosystems). The primers and probes (Online Resource 1) were designed with the Primer Express 2.0 software from Applied Biosystems.

AMPK and p70S6K Kinase Activity Assay and Detection by Western Blot

For the kinase activity assays, cells were cultured for 2 h in the presence of 0.5 mM of glucose. They were then incubated in medium containing either 0.5 or 10 mM of glucose for 2–4 h. Occasionally, cells were incubated in the presence or absence of different protein kinase or phosphatase inhibitors at the concentrations described in Table 1 for 30 min. In some cases, 10 nM GLP-1 was added during the last 10 min of the incubation. The cells were immediately lysed in RIPA buffer and exposed to microwave irradiation for 5 s. AMPK or p70S6K activation was detected by western blot using the antibodies described in Online Resource 2. Finally, the blots were scanned and quantified using Quantity One software (Biorad, GS800 Densitometer).

Statistical Analyses

All values are presented as means±SEM. Comparisons among groups were made using ANOVA. *P*<0.05 was considered statistically significant.

Table 1 Inhibitors of protein kinases and phosphatases

Inhibitors		Manufacturer	Concentration
PKA inhibitor	KT5720	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	200 nM
PKC inhibitor	Ro-318220	Bionova Científica, Madrid, Spain	10 mM
PI3K inhibitor	LY294002	Bionova Científica, Madrid, Spain	10 mM
MEK inhibitor	PD 98059	Calbiochem, Darmstadt, Germany	2 mM
mTOR inhibitor	Rapamicin	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	100 nM
Phosphatases inhibitors: PP2B and PP1	Okadaic acid sodium salt	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	10 mM 20 nM
CaMK inhibitor	KN62	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	3 mM
CaMKK inhibitor	STO-609	Sigma-Aldrich, Madrid, Spain	5 mM

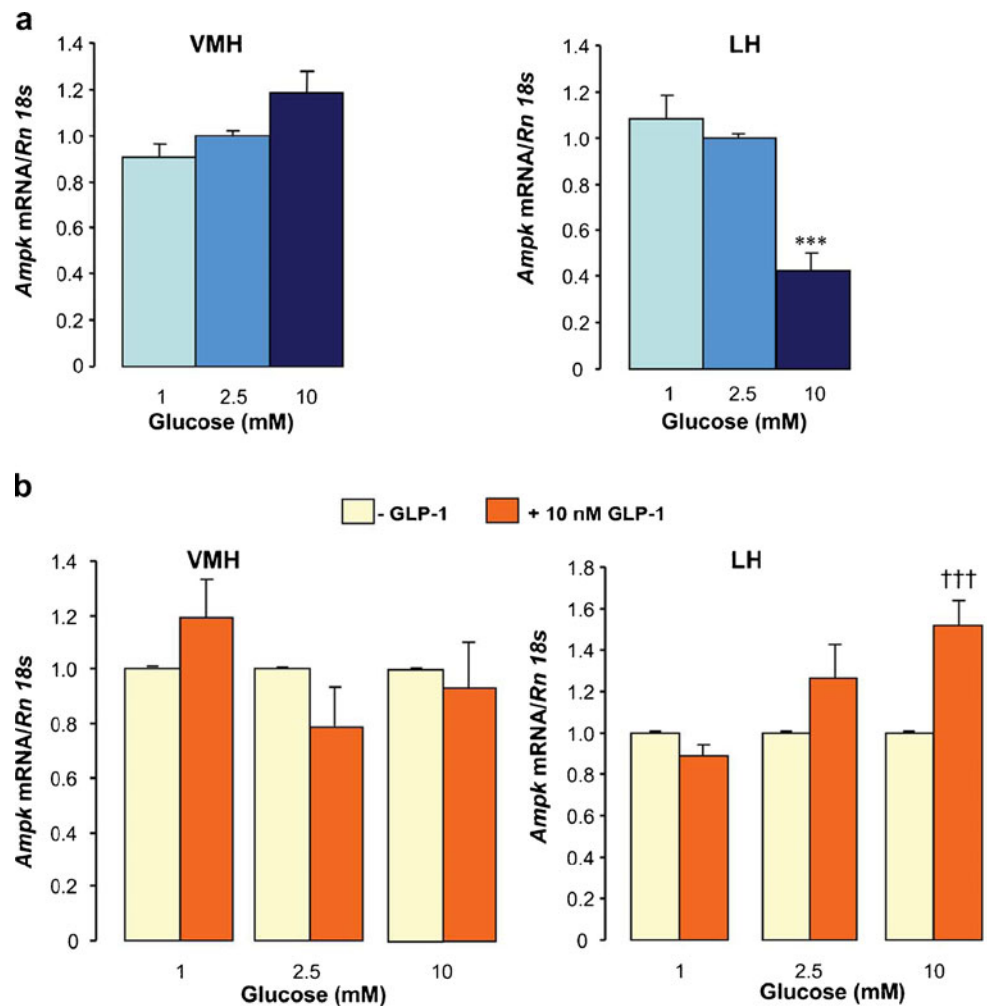
Results

Glucose and GLP-1 Regulate AMPK Expression in Hypothalamic Slice Explants

The mRNA levels of *Ampk-α2* were measured with real-time RT-PCR in hypothalamic slice explants after

treatment with different glucose concentrations (1, 2.5 or 10 mM) (Fig. 1a). High-glucose concentrations (10 mM) decreased, ~58%, the expression of the mRNA coding AMPKα2 in the LH area. The presence of GLP-1 was able to recover the decreased expression of AMPK caused by high-glucose concentrations in LH area (Fig. 1b).

Fig. 1 Glucose and GLP-1 modulate *Ampk-α2* expression in the VMH and LH areas. Organotypic hypothalamic slices of 300 μm were glucose-starved for 2 h and then cultured for 3 h in a medium containing 1, 2.5 or 10 mmol/l glucose in the presence or absence of 10 nM GLP-1. The VMH and LH areas were dissected from slices. *Ampk-α2* mRNA was quantified by real-time RT-PCR analysis. **a** Bars represent *Ampk-α2* mRNA levels normalized by *RNA 18s* and referred to the value obtained under the 2.5-mM glucose condition, considered as 1. **b** Bars represent *Ampk-α2* mRNA levels normalized by *RNA 18s* and referred to the value obtained in absence of GLP-1 that was considered as 1. Data are expressed as means±SEM; *n*=4–5 independent experiments performed in duplicate. ****P*<0.001 10 mM glucose vs 2.5 mM glucose, †††*P*<0.001, absence of GLP-1 vs the presence of 10 nM GLP-1



Glucose and GLP-1 Modulate AMPK and p70S6K Activities in Hypothalamic Slice Explants

Using hypothalamic slices, we tested whether GLP-1 modulated AMPK and p70S6K activities in the VMH and LH after exposure to low (0.5 mM)- and high (10 mM)-glucose concentrations in the presence or absence of 10 nM GLP-1. The activation of AMPK was checked using an anti-phospho-AMPK α (Thr172). Low-glucose concentrations increased the activity of AMPK in both hypothalamic nuclei by \approx 2-fold (Fig. 2a), while GLP-1 treatment reversed the low-glucose effect (Fig. 2a).

The activation of p70S6K was detected using anti-phospho-p70S6K (Thr389). High-glucose levels increased p70S6K activity in VMH and LH by \approx 3–10-fold (Fig. 2b), and the presence of GLP-1 reversed that activation.

Glucose and GLP-1 Modulate AMPK and p70S6K Activities in Hypothalamic GT1–7 and Neuroblastoma N2A Cell Lines

We used GT1–7 immortalized hypothalamic neurons and a neuroblastoma cell line to confirm the effects of low- or high-glucose concentrations on AMPK and p70S6K activities. We found that AMPK phosphorylation was dependent on the experimental conditions used to prepare the cell lysates. Initially, we detected considerable variability from 1 day to the other of the experiments. The degree of AMPK phosphorylation at different glucose concentrations was significantly different when the cell lysates were subjected or not to microwave irradiation for 5 s (Fig. 3). Our data suggested that the process employed to make up the cell extracts was a definitive step in obtaining reproducible results. At least in the case of AMPK, the level of the phosphorylated forms increased after cell lysis, even in the presence of Laemmli sample buffer (Fig. 3 and Online Resource 3). Exposure to microwave irradiation for 5–10 s immediately after the addition of cell lysis buffer was seen to be the most efficient method for maintaining the level of protein phosphorylation.

Using this cell lysis procedure in GT1–7 cells, we observed that the AMPK activities increased at low-glucose concentration (Fig. 4a) while the activation of p70S6K was seen at high-glucose concentrations (Fig. 4b). The presence of GLP-1 decreased the AMPK activity previously stimulated by low-glucose concentrations to a significant extent (Fig. 4a). This anorexigenic peptide also markedly attenuated the activation of p70S6K observed at high-glucose concentrations (Fig. 4b).

Low-glucose concentrations produced a rapid activation of AMPK in the N2A cells that persisted over time (Fig. 4c), and this activation was significantly inhibited by GLP-1 (Fig. 4c). However, the activation of p70S6K required incubations of more than 2 h with high glucose (Fig. 4d), and the

presence of GLP-1 also significantly decreased p70S6K activation (Fig. 4d).

Mechanisms of GLP-1 Signalling in the Activities of Metabolic Sensors

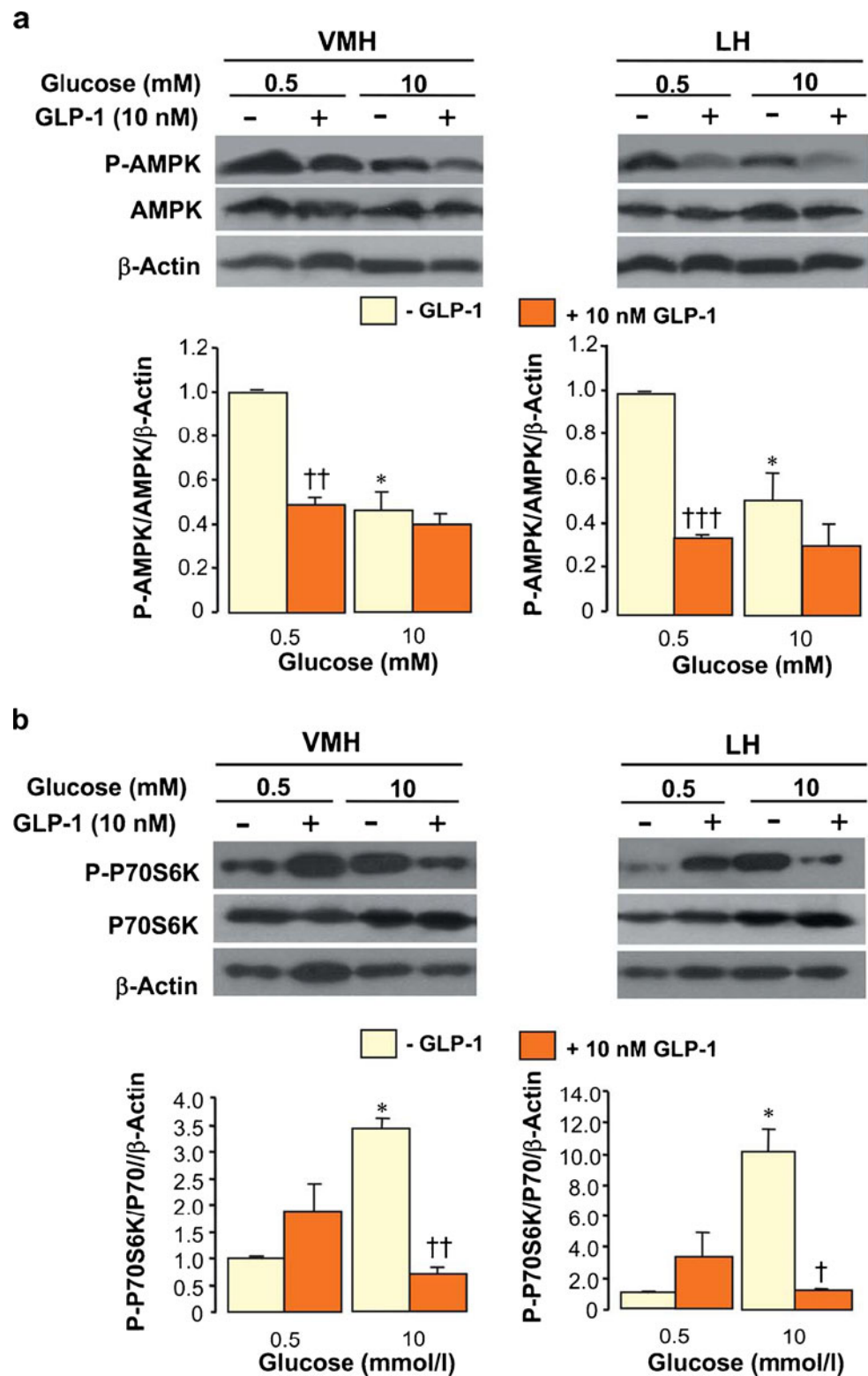
In a first attempt to elucidate the signalling pathways downstream from the GLP-1 receptor that mediate the regulation of hypothalamic metabolic sensors, we used several specific inhibitors of different protein kinases and phosphatases that could be involved in the signalling mechanism. The state of activation of AMPK remained unchanged in the presence of most of the inhibitors (Fig. 5a). However, the inhibitory effect of GLP-1 on AMPK phosphorylation was reversed in the presence of the protein phosphatase inhibitors PP1 and PP2B and inhibitors of the protein kinases PKA, PKC and PI3K (Fig. 5b).

Exendin-4 Regulates Hypothalamic AMPK and p70S6K Activities In Vivo in Obese and Lean Control Zucker Rats

The restriction of food for 48 h increased AMPK activity in the VMH and LH areas in both lean control and obese Zucker rats (Fig. 6). However, in both areas, AMPK activity was \approx 40–47% lower in the obese rats than in lean Zucker animals. Two hours of re-feeding after 48 h of fasting reduced by \approx 5-fold AMPK activity in both areas in all groups (Fig. 6 and Table 2). The effect of fasting on AMPK activity in Zucker lean controls was reversed by exendin-4 administration for 1 h, whereas the effect of exendin-4 in obese Zucker rats did not modify AMPK activity significantly. The reduction in AMPK activity observed in the VMH and LH areas, after re-feeding for 2 h, was reversed by exendin-4 treatment in both the obese and lean control rats (Fig. 6 and Table 2). Four hours of re-feeding reversed the AMPK activity of the VMH area up to fasted levels in both lean and obese rats (Fig. 6 and Table 2). Nevertheless, the AMPK activity of the LH area remained low in the lean rats (Fig. 6 and Table 2).

We also analysed p70S6K activity under the same conditions. Two hours of re-feeding, after 48 h of food deprivation, reduced p70S6K activity by \approx 2–3-fold in both areas in all groups, and 4 h later, p70S6K activity increased by \approx 2–4-fold as compared to 2 h (Fig. 7 and Table 3). The effect of exendin-4 administration in the fasted rats did not change p70S6K activity significantly (Fig. 7 and Table 3). After of 2 h re-feeding, exendin-4 treatment increased p70S6K activity in the VMH and LH in all groups. Nevertheless, the effect of exendin-4 on p70S6K activity in the VMH differed in the obese and lean rats. While exendin-4 administration did not modify p70S6K activity in lean rats to any significant extent, it dramatically increased p70S6K activity in obese rats. However, no significant effect was observed for exendin-4

Fig. 2 Glucose and GLP-1 regulated AMPK and p70S6K activities in the VMH and LH areas. Hypothalamic slice explants were glucose-starved for 2 h and then cultured for 2 h in DMEM containing 2% FBS, 4 mM glutamine, 100 U/ml penicillin–streptomycin and either 0.5 or 10 mM glucose. In some cases, 10 nM GLP-1 was added during the last 10 min of culture. The VMH and LH areas were isolated by micro-punching, lysed in RIPA buffer and exposed for 5 s to microwave irradiation and then processed for western blot analysis of phospho-AMPK (Thr-172) (P-AMPK) and total AMPK (AMPK) (**a**) and phospho-p70S6K (Thr-389) (P-P70S6K) and total p70S6K (P70S6K) (**b**). The blots were reprobed for β -actin. Densitometric values normalized by β -actin and by non-phosphorylated forms and referred to the value of 0.5 mM glucose without GLP-1 in VMH, taken as 1. Results are means \pm SEM; $n=3$. * $P<0.05$ 10 mM glucose vs 0.5 mM glucose and $^{\dagger}P<0.05$, $^{\dagger\dagger}P<0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P<0.001$, absence of GLP-1 vs the presence of 10 nM GLP-1



administration after 4 h of re-feeding on p70S6K activity in the LH of lean and obese rats, while the exendin-4 reduced p70S6K activity in the VMH of lean but not of obese Zucker rats.

Discussion

In recent years, AMPK has been proposed as a cellular energy sensor that is able to assemble many regulatory

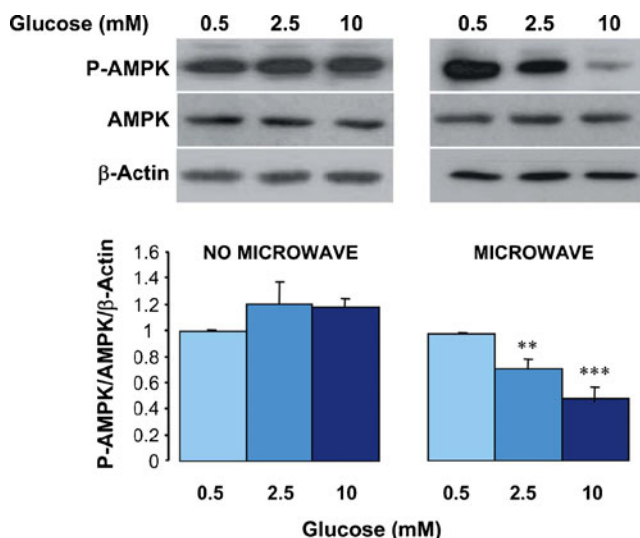


Fig. 3 Importance of the microwave irradiation in the stability of the phosphorylated AMPK forms in the cell-lysate. N2A cells were cultured in DMEM/F-12 containing 10% FBS, 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml) and 0.5 mM glucose for 2 h. Then, the medium was removed and the cells were incubated for 2 h in a medium containing 0.5, 2.5 or 10 mM glucose. N2A cells were immediately lysed in RIPA buffer and exposed or not to microwave irradiation for 5 s, and then Laemmli buffer was added and processed for western blot analysis of phospho-AMPK (Thr-172) (P-AMPK) and total AMPK (AMPK). The blots were reprobed for β -Actin. Densitometric values were normalized by β -actin and by non-phosphorylated forms. The value obtained in the cells treated with 0.5 mM glucose was taken as 1. The results are means \pm SEM; $n=4-5$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ as compared with 0.5 mM glucose

signals and nutritional environmental changes, and it is also involved in maintaining whole-body energy balance [31]. The regulation of AMPK activity located in the hypothalamic areas involved in the control of feeding behaviour has also been described as a mechanism for the detection of nutritional variations, including glucose levels [32]. The results of several studies have indicated that hypothalamic AMPK activity is regulated by glucose levels and by changes in nutrients and hormones responding to the nutritional status. In general, AMPK is activated by fasting and is inhibited by re-feeding [7], but in the hypothalamus hypoglycaemia induces the activation of hypothalamic AMPK, specifically in the VMH and PVN but not in the LH [32]. mTOR is one of the downstream targets of AMPK in which elevated glucose concentrations activate the mTOR/p70S6K pathway and cause an inhibition of food intake. In the present study, we confirm the notion that the effects of glucose on AMPK and p70S6K are region-specific in hypothalamic areas that have opposite effects over the control of feeding behaviour. These effects were found both in vitro, using hypothalamic slices, and in vivo, in lean and obese Zucker rats, and it was also observed that GLP-1 was able to modulate AMPK and p70S6K activities, depending on the state of activation.

Rat hypothalamic slices have previously been reported to preserve some tissue architecture and functional connections, maintaining a selective c-Fos expression in response to different glucose concentrations [27] similar to the functional activity found in vivo [33]. Sanz et al. reported a different response to glucose in the VMH and LH [27, 28]. Using the same experimental approach, here we show that high-glucose levels decrease the expression of *Ampk- α 2*, specifically in the LH. In previous work [34], changes in *Ampk* expression have been reported. Thus, 3 days of insulin-induced hypoglycaemia produced an increase in the gene expression of *Ampk* throughout the hypothalamus, and Seo et al. reported an increase in *Ampk* mRNA in the hypothalamus of fasted rats and that the intracerebroventricular administration of GLP-1 attenuated such an effect [35]. Our results confirm the idea that GLP-1 treatment is able to modulate *Ampk- α 2* expression and indicate a distinctive response in the LH as compared to the VMH. This result can be explained in terms of the different roles of these two areas in the control of food intake, previously defined as centres of hunger and satiety respectively. It is generally accepted that pharmacological activation of AMPK in the liver and muscle may elicit a decrease in blood glucose and lipid levels that could be useful in the treatment of type 2 diabetes [36].

Our results suggest that increased glucose levels, which could be similar to those found in uncontrolled diabetic patients, may modulate not only AMPK activity but also the expression of *Ampk*, possibly in a cell-specific way in different brain areas. It has been reported that in normoglycaemic rats, the extracellular glucose concentration in the brain was ~ 2.5 mM and increased to ~ 4.5 mM at blood glucose levels of ~ 15 mM [37]. Previous data using neuroblastoma cells indicated that ATP concentration increased markedly in a range of 1–5 mM glucose and the concentration of ATP above of 5 mM glucose was maintained stable [38]. In our study, we have used 0.5 mM as low-glucose concentration and 10 mM as high-glucose concentration. Apparently, 10 mM glucose could be considered too high in brain, although the blood glucose levels in obese animals can be higher than 20 mM [15].

Previously, it has been reported that anorexigenic peptides decrease AMPK α 2 activity [7, 39]. Other authors have also reported that insulin and leptin increase the phosphorylation of p70S6K and that treatment with rapamycin, a mTOR inhibitor, blocks the effect of leptin [10].

In our study, GLP-1 also modulated AMPK and p70S6K activities in the VMH and LH. An interesting finding was that the effect of this peptide was always dependent on the activation status of AMPK and p70S6K, requiring maximum activation of these sensors to exert it. Thus, at low-glucose concentrations, AMPK activity was stimulated and p70S6K activity was maintained with minimal activation,

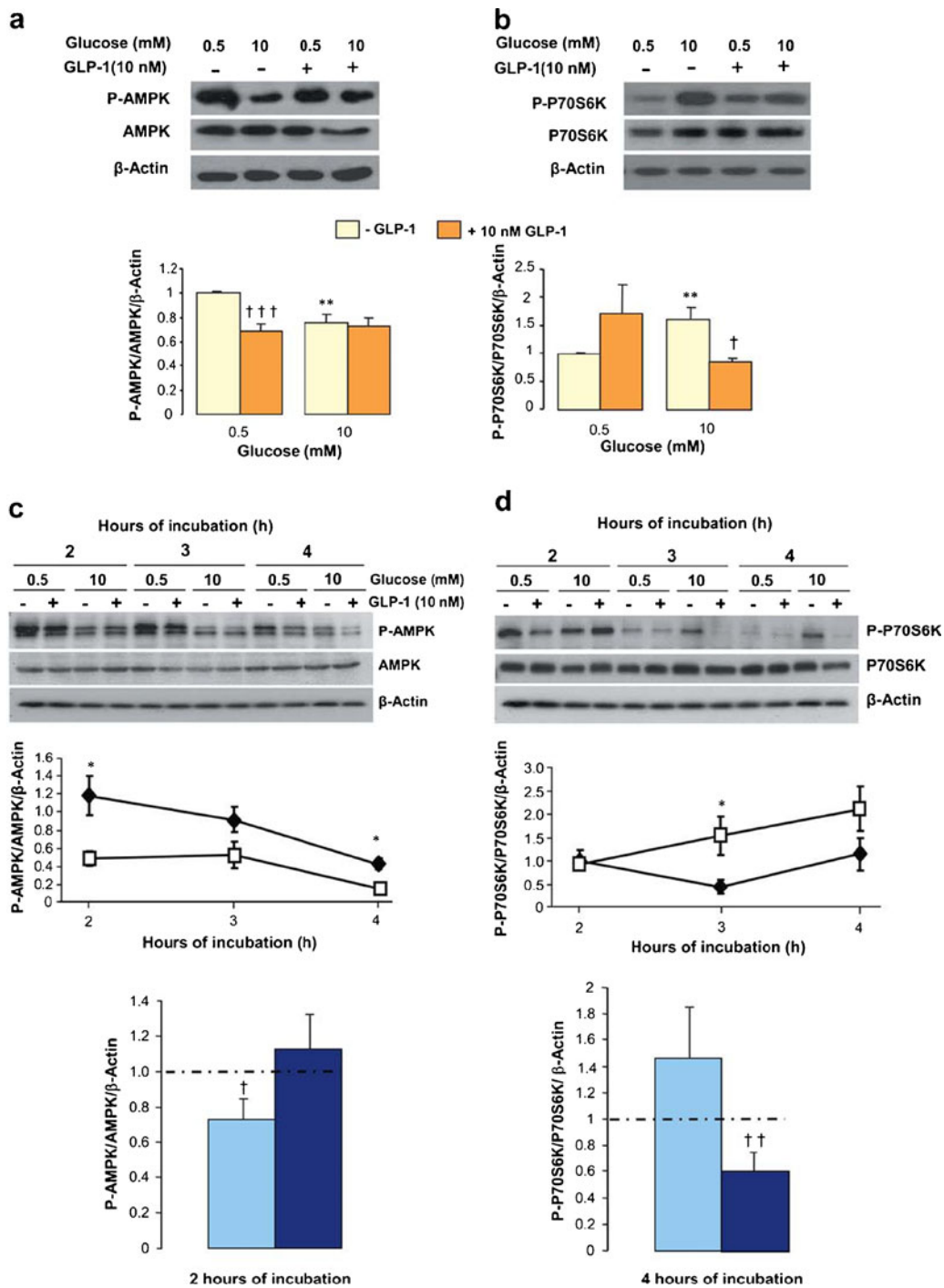


Fig. 4 Glucose and GLP-1 modulate AMPK and p70S6K activation in the hypothalamic GT1-7 and neuroblastoma N2A cell lines. GT1-7 and N2A cells were cultured in DMEM or DMEM/F-12, respectively, containing 10% FBS, 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml) and 0.5 mM glucose for 2 h. Then, the medium was removed and the cells were incubated for 2, 3 or 4 h in a medium containing 0.5 or 10 mM glucose. Finally, cells were treated or not with 10 nM GLP-1 for 10 min. GT1-7 cells were immediately lysed in RIPA buffer and exposed to microwave irradiation for 5 s, and then processed for western blot analysis of phospho-AMPK (Thr-172) (P-AMPK) and total AMPK (AMPK) (a) and phospho-p70S6K (Thr-389) (P-P70S6K) and total p70S6K (P70S6K) (b). N2A cells were immediately lysed in RIPA

buffer and exposed to microwave irradiation for 5 s and then processed for western blot analysis of phospho-AMPK (Thr-172) (P-AMPK) and total AMPK (AMPK) (c) and phospho-p70S6K (Thr-389) (P-P70S6K) and total p70S6K (P70S6K) (d). The blots were reprocessed for β-Actin. Densitometric values, normalized by β-actin and non-phosphorylated forms, were referred to a value of 0.5 mM glucose 2 h without GLP-1, taken as 1. The *line graphs* represent the effect of glucose on AMPK and p70S6K activation at different incubation times. The results are means ± SEM; n=4–5. *P<0.05; 10 mM glucose vs 0.5 mM glucose. The *bar graphs* represent the effect of GLP-1 on AMPK and p70S6K activation. Horizontal line indicates the absence of GLP-1. †P<0.05, ††P<0.01 absence of GLP-1 vs presence of 10 nM GLP-1

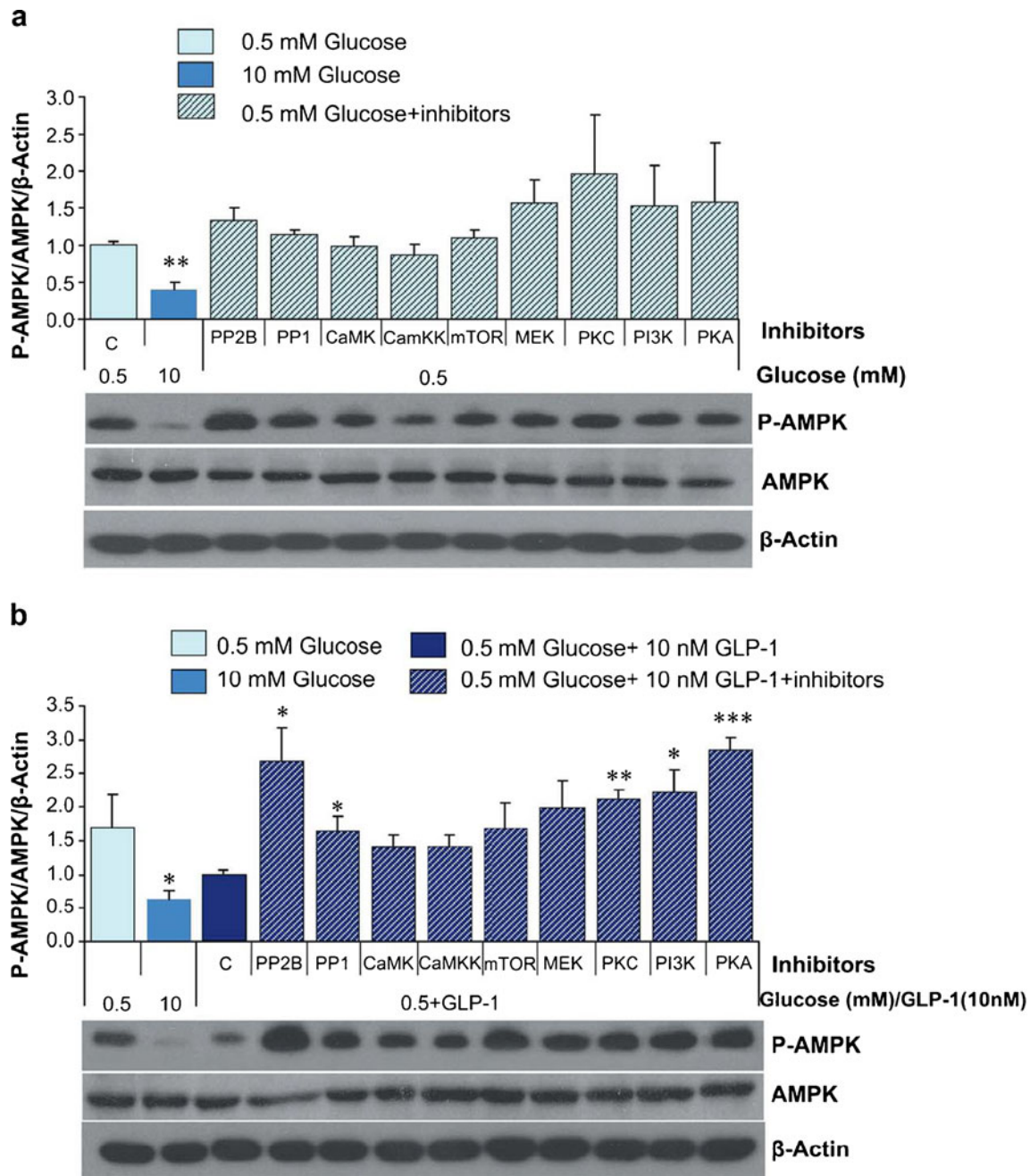


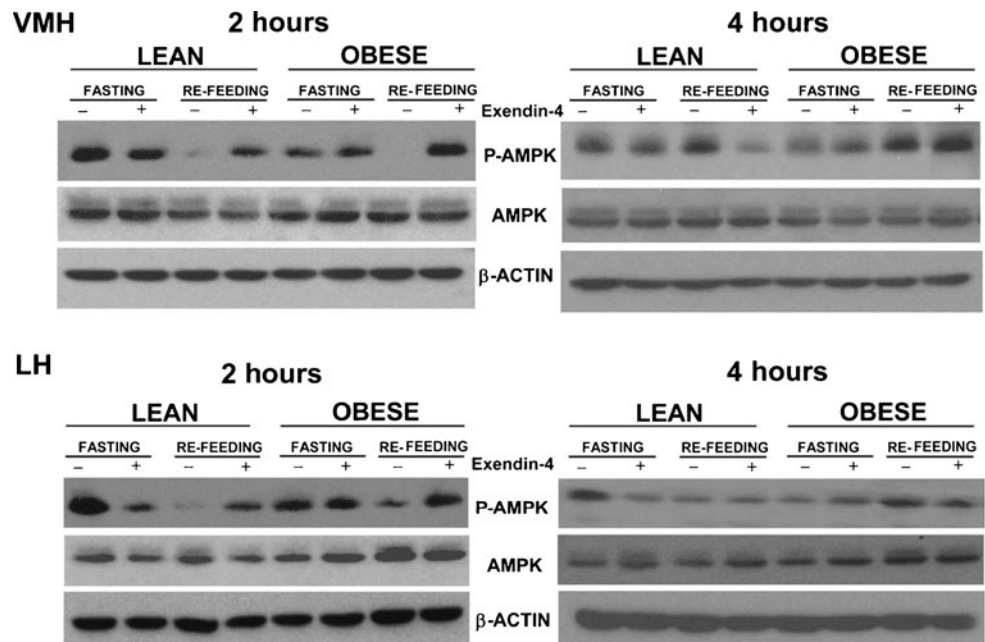
Fig. 5 Impact of several protein kinases and phosphatases inhibitors on the GLP-1-induced inhibition of AMPK activity at low-glucose concentrations. N2A cells were incubated in the presence of 0.5 mM glucose 2 h, treated or not with several inhibitors for 30 min (Table 1), in the absence (**a**) or presence (**b**) of 10 nM GLP-1 over the last 10 min. Cell lysates were exposed to microwave irradiation for 5 s and then processed for western blot analysis of phospho-AMPK (Thr-172) (P-AMPK) and total AMPK (AMPK) (**a**, **b**). Densitometric values were

normalized by β -actin and by non-phosphorylated forms. **a** The value of 0.5 mM glucose without inhibitors was taken as 1 (**c**). The results are means \pm SEM; $n=3-4$. $**P<0.01$, 10 mM glucose compared with 0.5 mM glucose. **b** The value obtained in the cells treated with 0.5 mM glucose and 10 nM GLP-1 without inhibitors (**c**) was taken as 1. The results are means \pm SEM; $n=3-4$. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ vs without inhibitors

while GLP-1 treatment reversed the effect of glucose on AMPK and did not modify p70S6K activity in the VMH and LH. High levels of glucose led to the activation of p70S6K in both nuclei, and the presence of

GLP-1 reversed such activation. Similar results were found using hypothalamic GT1-7 and neuroblastoma N2A cell lines. The metabolic sensors in these cells respond to glucose as described above and GLP-1

Fig. 6 Exendin-4 modulated hypothalamic AMPK activity in obese and lean control Zucker rats. Animals were food-deprived for 48 h, after which they were re-fed for 2 or 4 h and some of them were treated s.c. with exendin-4 (250 ng/100 g body weight or vehicle for 1 h). The VMH and LH hypothalamic areas were isolated by micropunching. Tissues were lysed in RIPA buffer, exposed to microwave irradiation for 5 s and then processed for western blot analysis of phospho-AMPK (Thr-172) (P-AMPK) and total AMPK (AMPK). The blots were reprobed for β -actin



treatment reversed de glucose effects. For this analysis, the cells grown in high (25 mM)-glucose medium were serum-starved in medium containing 0.5 mM glucose for 2 h in order to initiate the stimulation in more physiological conditions. The cells showed no apparent signs of glucotoxicity in accordance with previous studies using N2A maintained in medium containing 25 mM glucose as control in studies of toxicity [40].

Here we report that the level of AMPK protein phosphorylation increased even after cell lysis in the presence of Laemmli sample buffer. In order to arrest any changes in the

phosphorylation of the cell homogenates after cell lysis, the extracts were always immediately exposed to microwave irradiation. This method proved to be the most efficient way to maintain the level of protein phosphorylation, in accordance with a previously reported method of tissue preparation [41].

The signalling pathways targeted by GLP-1 that are involved in the modulation of hypothalamic metabolic sensors remain largely unknown. As a first approach to elucidating some of these protein kinases or phosphatases that might be involved in the actions of GLP-1,

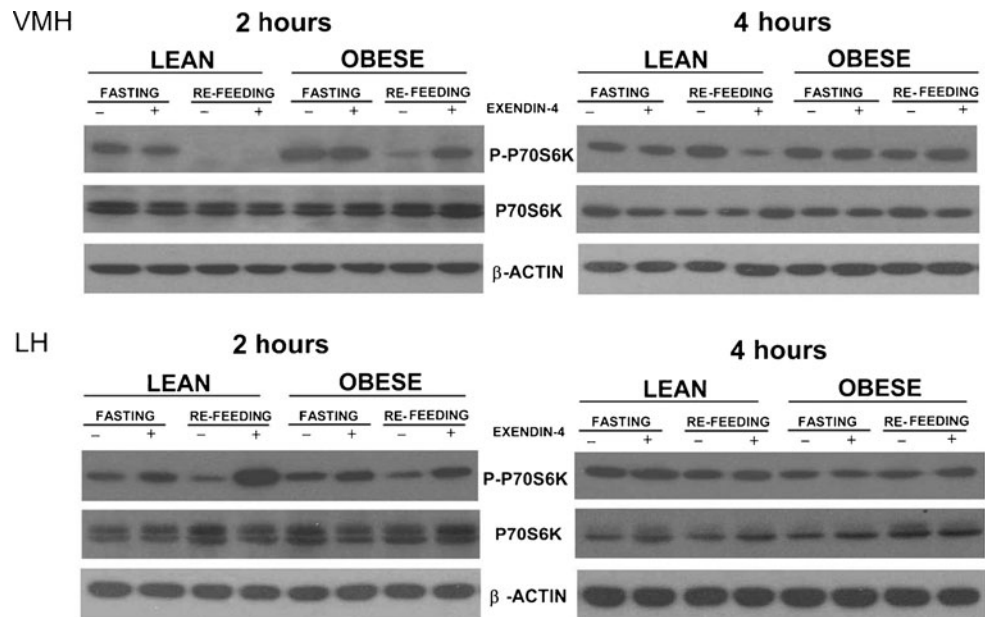
Table 2 Hypothalamic AMPK activity in obese and lean control Zucker rats in response to different nutritional status and exendin-4 treatment

		Zucker rats			
		Lean		Obese	
Hypothalamic area	Nutritional status	Untreated	Exendin-4	Untreated	Exendin-4
VMH	Fasting	1.00	0.53±0.10 ^g	1.00 (0.53±0.1 ^c)	1.51±0.25
	Re-feeding 2 h	0.23±0.063 ^b	2.17±0.15 ^g	0.20±0.08 ^b	2.63±0.18 ^h
	Re-feeding 4 h	1.18±0.08 ^c	0.29±0.01 ^h	1.34±0.29 ^c	1.19±0.07
LH	Fasting	1.00	0.35±0.08 ^h	1.00 (0.59±0.09 ^c)	0.95±0.11
	Re-feeding 2 h	0.18±0.11 ^b	6.42±1.68 ^f	0.12±0.04 ^b	2.49±0.16 ^h
	Re-feeding 4 h	0.39±0.08 ^a	0.73±0.18	1.29±0.24 ^d	0.91±0.10

Animals were food-deprived for 48 h, after which they were re-fed for 2 or 4 h and some of them were treated s.c. with exendin-4 (250 ng/100 g body weight or vehicle for 1 h). Data expressed as the densitometric values of phospho-AMPK (Thr-172) normalized by total AMPK and β -actin (Fig. 6). Results are means±SEM. The data represent the response to nutritional status (untreated) relative to the value obtained in lean and obese fasted animals, both VMH and LH, taken as 1; $n=3-9$

^a $P<0.05$; ^b $P<0.001$ (re-feeding vs fasting); ^c $P<0.001$ (values in parentheses fasting obese rats vs fasting lean rats); ^d $P<0.01$; ^e $P<0.001$ (re-feeding 4 h vs re-feeding 2 h); ^f $P<0.05$; ^g $P<0.01$; ^h $P<0.001$ (exendin-4 treated vs untreated)

Fig. 7 Exendin-4 modulated hypothalamic p70S6K activity in obese and lean control Zucker rats. Animals were food-deprived for 48 h, after which they were re-fed for 2 or 4 h and some of them were treated s.c. with exendin-4 (250 ng/100 g body weight or vehicle for 1 h). The VMH and LH hypothalamic areas were isolated by micropunching. Tissues were lysed in RIPA buffer, exposed to microwave irradiation for 5 s and then processed for western blot analysis. The levels of phospho-p70S6K (Thr-389) (P-P70S6K) and total p70S6K (P70S6K) were analysed by western blot. The blots were re-probed for β -actin



we used specific inhibitors in the N2A cell line. The results obtained suggest that the signalling pathway initiated at the GLP-1 receptor may be mediated through the activation of PKA, PKC and PI3K and that GLP-1 would enhance the effect of the PP2 inhibitor to a significant extent. These results are in accordance with recent findings reported by Hayes et al. [42], relating increased PKA and mitogen-activated protein kinase activity to the suppression of food intake by GLP-1 in the nucleus of the tractus solitaries, or those indicating that the anorexic actions of insulin or leptin can be

blocked by the inhibition of PI3K and that kinase mediates mTOR and p70S6K activation [43, 44]. Several reports have also described that the regulation of AMPK activity depends on the activity of protein phosphatases [45, 46].

A further step was to use an *in vivo* model involving Zucker rats to analyse the effect of the GLP-1 agonist on hypothalamic AMPK and p70S6K activities. The obese Zucker (fa/fa) rat offers a well-established animal model of insulin resistance and genetic obesity and, in comparison with lean Zucker rat, exhibits hyperinsulinemia and

Table 3 Hypothalamic p70S6K activity in obese and lean control Zucker rats in response to different nutritional status and exendin-4 treatment

Hypothalamic area	Nutritional status	Zucker rats			
		Lean		Obese	
		Untreated	Exendin-4	Untreated	Exendin-4
VMH	Fasting	1.00	1.41±0.41	1.00 (1.22±0.23)	0.83±0.09
	Re-feeding 2 h	0.47±0.10 ^b	1.61±0.60	0.37±0.17 ^a	5.60±0.53 ^f
	Re-feeding 4 h	1.70±0.36 ^d	0.28±0.06 ^c	1.54±0.40 ^c	1.11±0.17
LH	Fasting	1.00	0.95±0.15	1.00 (0.78±0.22)	1.34±0.33
	Re-feeding 2 h	0.28±0.08 ^b	3.46±0.51 ^e	0.54±0.12 ^a	2.50±0.35 ^e
	Re-feeding 4 h	0.74±0.08 ^c	0.77±0.09	1.22±0.20 ^c	1.01±0.14

Animals were food-deprived for 48 h, after which they were re-fed for 2 or 4 h and some of them were treated s.c. with exendin-4 (250 ng/100 g body weight or vehicle for 1 h). Data are expressed as the densitometric values of phospho-p70S6K (Thr-389) normalized by total p70S6K and β -actin (Fig. 7). Results are means±SEM. The data represent the response to nutritional status (untreated) relative to the value obtained in lean and obese fasted animals, both VMH and LH, taken as 1; $n=3-7$. Values in parentheses fasting obese rats vs fasting lean rats

^a $P<0.01$; ^b $P<0.001$ (re-feeding vs fasting); (values in parentheses fasting obese rats vs fasting lean rats); ^c $P<0.05$; ^d $P<0.01$ (re-feeding 4 h vs re-feeding 2 h); ^e $P<0.01$; ^f $P<0.001$ (exendin-4 treated vs untreated)

hyperlipidemia. We have previously described that peripheral long-term s.c. administration of exendin-4 decreased food intake and induced weight loss in both obese and lean control Zucker rats [15]. Our results showed that AMPK activity in the VMH and LH from lean and obese rats was increased during starvation and that it was inhibited at 2 h after re-feeding as reported previously [7, 8]. Notably, the level of AMPK activation was lower in the obese than in lean Zucker rats in both areas. This result could be due to alterations in the levels of nutrients and hormones in obese rats. An unexpected result was obtained upon analysing the effect of fasting and re-feeding on p70S6K activity. This decreased significantly in the VMH and LH of animals that were re-fed for 2 h as compared to fasted animals. The activation of p70S6K was only observed after 4 h of re-feeding. The analysis of p70S6K activity in response to high-glucose levels in N2A cells also showed that the response to an increase in glucose levels required at least a period of 3–4 h. Cota et al. [10] have previously reported a decrease in phospho-p70S6K in fasted rats as compared with rats re-fed for 3 h. It is possible that in our experiments, maximum activation of p70S6K was not detected and thus could account for the lack of significant differences between the p70S6K activities observed in fasted animals and those re-fed for 4 h. Our data indicate that at least with our experimental design, the lowest level of p70S6K activity in the VMH and LH was present in rats that were re-fed for 2 h.

Here we show that the effect of fasting on hypothalamic AMPK activity from lean Zucker rats is reversed by s.c. exendin-4 administration for 1 h, whereas the effect of exendin-4 on fasted obese Zucker rats does not significantly modify AMPK activity. This could compensate the decrease in AMPK activity observed in the VMH and LH in obese Zucker as compared to lean control rats. Our results also indicate that exendin-4 could activate AMPK when AMPK activity is strongly inhibited, as in animals re-fed for 2 h. Accordingly, GLP-1 seems to act as a compensator for the variations in AMPK, activity produced either by oscillations in glucose levels or by pathologies such as obesity or episodes of hyperinsulinemia. The complexities of the regulation of hypothalamic AMPK activity under different feeding conditions have been described previously for some hormones. Thus, ghrelin or cannabinoids have ad libitum effects [47], whereas leptin [7] and adiponectin [48] only have an effect after variable times of fasting or re-feeding. The cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) has been reported to have anorexic effect after intracerebroventricular administration [49], while CART injected directly into the paraventricular or arcuate nucleus of fasted rats increases food intake [50].

Previous work has indicated that anorexic peptides enhance the mTOR/p70S6K pathway, leading to inhibition of food intake. Cota et al. reported that insulin and leptin increase the phosphorylation of p70S6K [10]. Here we report that exendin-4 modulates p70S6K activity, and it is indeed remarkable that the effect of exendin-4 depends on the activation status of p70S6K, as occurred with AMPK. Thus, exendin-4 stimulates p70S6K activity in animals re-fed for 2 h, these animals showing the lowest activation of p70S6K, while—in contrast—exendin-4 decreases p70S6K activity in the VMH of lean rats re-fed for 4 h to a significant extent.

Ono et al. [51] have suggested that hypothalamic p70S6K activation would be involved in the pathogenesis of diet-induced hepatic insulin resistance. The prolonged activation of hypothalamic p70S6K produces the inhibition of insulin signalling and contributes to hepatic insulin resistance. Our data indicate that in the presence of exendin-4, p70S6K activity could be decreased when this protein is maximally activated. This suggests that exendin-4 treatment in diabetic subjects also could improve hepatic insulin resistance.

Finally, the results reported here indicate that in the VMH and LH areas, GLP-1 modulates the activation status of AMPK and p70S6K in response to variations in glucose or in pathological states such as obesity and insulin resistance. We also present experimental evidence of some of the kinases or phosphatases that may mediate these GLP-1 actions. Also, the data obtained suggest a potential role for GLP-1 or exendin-4 as preservers of the hypothalamic AMPK and p70S6K activities in some pathological states.

Acknowledgements We thank Prof P. Mellon for the generous gift of the GT1-7 cell line. This work was supported by grants from MICINN (SAF2006-0475 and SAF2009-11297), Ayudas del Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación UCM-Banco Santander (GR58/08 and GR35/10A), Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña and IODURE project and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, an initiative of ISCIII (Ministerio de Ciencia e Innovación).

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Hardie DG, Carling D, Carlson M (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67:821–855
2. Rutter GA, Da Silva XG, Leclerc I (2003) Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J* 375(Pt 1):1–16

3. Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (10):774–785
4. Jorgensen SB, Viollet B, Andreelli F, Frosig C, Birk JB, Schjerling P, Vaulont S, Richter EA, Wojtaszewski JF (2004) Knockout of the $\alpha 2$ but not $\alpha 1$ 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J Biol Chem* 279(2):1070–1079
5. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloan A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S (2003) The AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* 111(1):91–98
6. Viollet B, Athea Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L (2009) AMPK: lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci* 14:19–44
7. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Foufelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428(6982):569–574
8. Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, Yun JY, Namgoong IS, Ha J, Park IS, Lee IK, Viollet B, Youn JH, Lee HK, Lee KU (2004) Anti-obesity effects of α -lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 10(7):727–733
9. Lim CT, Kola B, Korbonits M (2010) AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol* 44(2):87–97
10. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312(5775):927–930
11. Vodenik B, Rovira J, Campistol JM (2009) Mammalian target of rapamycin and diabetes: what does the current evidence tell us? *Transplant Proc* 41(6 Suppl):S31–S38
12. Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Thorens B, Blazquez E (1996) Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem* 66(3):920–927
13. Blazquez E, Alvarez E, Navarro M, Roncero I, Rodriguez-Fonseca F, Chowen JA, Zueco JA (1998) Glucagon-like peptide-1 (7–36) amide as a novel neuropeptide. *Mol Neurobiol* 18(2):157–173
14. Navarro M, Rodriguez de Fonseca F, Alvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gomez R, Eng J, Blazquez E (1996) Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem* 67 (5):1982–1991
15. Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Maestre O, Gomez R, Munoz RM, Eng J, Blazquez E (2000) Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism* 49(6):709–717
16. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379(6560):69–72
17. Alvarez E, Martinez MD, Roncero I, Chowen JA, Garcia-Cuartero B, Gisbert JD, Sanz C, Vazquez P, Maldonado A, de Caceres J, Desco M, Pozo MA, Blazquez E (2005) The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem* 92(4):798–806
18. Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Vazquez P, Blazquez E (2002) Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. *J Neurochem* 80(1):45–53
19. Roncero I, Alvarez E, Chowen JA, Sanz C, Rabano A, Vazquez P, Blazquez E (2004) Expression of glucose transporter isoform GLUT-2 and glucokinase genes in human brain. *J Neurochem* 88(5):1203–1210
20. Roncero I, Alvarez E, Vazquez P, Blazquez E (2000) Functional glucokinase isoforms are expressed in rat brain. *J Neurochem* 74 (5):1848–1857
21. Mountjoy PD, Bailey SJ, Rutter GA (2007) Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity. *Diabetologia* 50(1):168–177
22. Claret M, Smith MA, Batterham RL, Selman C, Choudhury AI, Fryer LG, Clements M, Al-Qassab H, Heffron H, Xu AW, Speakman JR, Barsh GS, Viollet B, Vaulont S, Ashford ML, Carling D, Withers DJ (2007) AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 117 (8):2325–2336
23. Niswender K (2010) Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction—a complex interplay. *Diabetes Obes Metab* 12 (4):267–287
24. Blonde L, Klein EJ, Han J, Zhang B, Mac SM, Poon TH, Taylor KL, Trautmann ME, Kim DD, Kendall DM (2006) Interim analysis of the effects of exenatide treatment on A1C, weight and cardiovascular risk factors over 82 weeks in 314 overweight patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 8(4):436–447
25. Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, Schmidt WE, Montanya E, Brett JH, Zychma M, Blonde L (2009) Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet* 374(9683):39–47
26. Montanya E, Sesti G (2009) A review of efficacy and safety data regarding the use of liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 31(11):2472–2488
27. Sanz C, Roncero I, Vazquez P, Navas MA, Blazquez E (2007) Effects of glucose and insulin on glucokinase activity in rat hypothalamus. *J Endocrinol* 193(2):259–267
28. Sanz C, Vazquez P, Navas MA, Alvarez E, Blazquez E (2008) Leptin but not neuropeptide Y up-regulated glucagon-like peptide 1 receptor expression in GT1–7 cells and rat hypothalamic slices. *Metabolism* 57(1):40–48
29. Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5(1):1–10
30. Paxinos G, Watson C (2004) The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, New York
31. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW (2006) AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept. *J Physiol* 574 (Pt 1):7–15
32. Mountjoy PD, Rutter GA (2007) Glucose sensing by hypothalamic neurones and pancreatic islet cells: AMPle evidence for common mechanisms? *Exp Physiol* 92(2):311–319
33. Solomon A, De Fanti BA, Martinez JA (2006) Peripheral ghrelin participates in the glucostatic signaling mediated by the ventromedial and lateral hypothalamus neurons. *Peptides* 27(7):1607–1615
34. McCrimmon RJ, Shaw M, Fan X, Cheng H, Ding Y, Vella MC, Zhou L, McNay EC, Sherwin RS (2008) Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes* 57(2):444–450
35. Seo S, Ju S, Chung H, Lee D, Park S (2008) Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *Endocr J* 55(5):867–874

36. Long YC, Zierath JR (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116(7):1776–1783
37. Silver IA, Erecinska M (1994) Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci* 14(8):5068–5076
38. Lee K, Li B, Xi X, Suh Y, Martin RJ (2005) Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology* 146(1):3–10
39. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ (2004) AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279(13):12005–12008
40. Manzoni C, Colombo L, Bigini P, Diana V, Cagnotto A, Messa M, Lupi M, Bonetto V, Pignataro M, Airolidi C, Sironi E, Williams A, Salmona M (2011) The molecular assembly of amyloid abeta controls its neurotoxicity and binding to cellular proteins. *PLoS One* 6(9):e24909
41. Scharf MT, Mackiewicz M, Naidoo N, O'Callaghan JP, Pack AI (2008) AMP-activated protein kinase phosphorylation in brain is dependent on method of killing and tissue preparation. *J Neurochem* 105(3):833–841
42. Hayes MR, Lechner TM, Zhao S, Lee GS, Chowansky A, Zimmer D, De Jonghe BC, Kanoski SE, Grill HJ, Bence KK (2011) Intracellular signals mediating the food intake-suppressive effects of hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation. *Cell Metab* 13(3):320–330
43. Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr, Schwartz MW (2001) Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 413(6858):794–795
44. Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG Jr, Seeley RJ, Schwartz MW (2003) Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52(2):227–231
45. Woods A, Vertommen D, Neumann D, Turk R, Bayliss J, Schlattner U, Wallimann T, Carling D, Rider MH (2003) Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 278(31):28434–28442
46. Garcia-Haro L, Garcia-Gimeno MA, Neumann D, Beullens M, Bollen M, Sanz P (2010) The PP1-R6 protein phosphatase holoenzyme is involved in the glucose-induced dephosphorylation and inactivation of AMP-activated protein kinase, a key regulator of insulin secretion, in MIN6 beta cells. *Faseb J* 24(12):5080–5091
47. McCrimmon RJ, Fan X, Cheng H, McNay E, Chan O, Shaw M, Ding Y, Zhu W, Sherwin RS (2006) Activation of AMP-activated protein kinase within the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses in rats with defective counterregulation. *Diabetes* 55(6):1755–1760
48. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T (2007) Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 6(1):55–68
49. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393(6680):72–76
50. Abbott CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA, Zollner AN, Morgan DG, Morgan I, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR (2001) Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* 142(8):3457–3463
51. Ono H, Pocai A, Wang Y, Sakoda H, Asano T, Backer JM, Schwartz GJ, Rossetti L (2008) Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest* 118(8):2959–2968

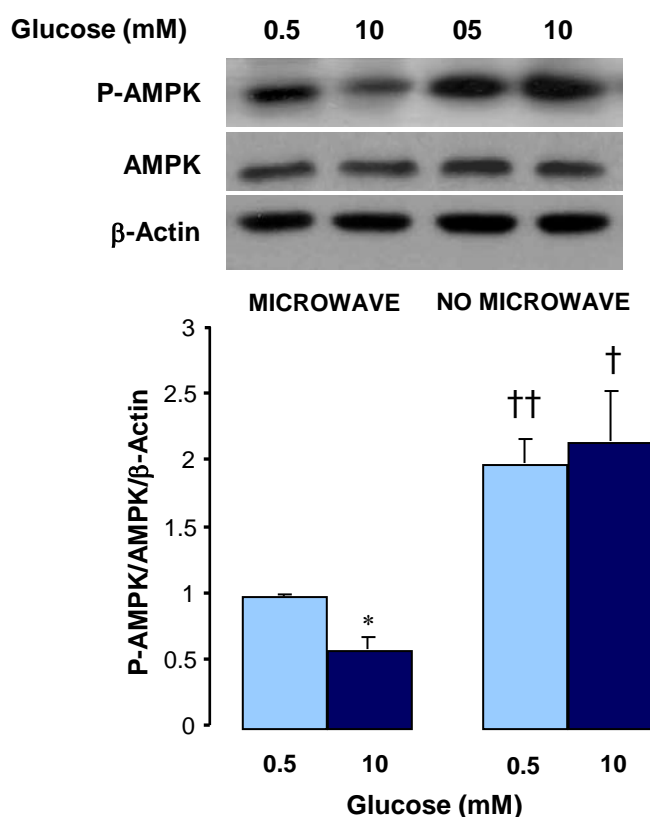
Electronic supplementary material
Online Resource 1. Primers and probes for real-time RT-PCR analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer	Taqman probe
<i>Ampk-α2</i>	5'-GTGGATCGCCAAATTATGCA-3'	5'-GGGAGGGTGCCACAGAGAA-3'	5'-6-FAM-TAC AGC CTT CTT GAC ATG A-MGB-3'
<i>18s</i>			Hs 99999901_s1

Electronic supplementary material**Online Resource 2.** Antibodies and conditions used for western blot assays

Antibody	Host	Manufacturer	Dilution used
Anti-AMPK α 2	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-phospho AMPK α (Thr172)	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-p70S6K	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-phospho p70S6K(Thr389)	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti- β -Actin	Mouse	Sigma Aldrich, Madrid, Spain	1:5000
Anti-Rabbit-HRP	Goat	Millipore Iberica, Madrid, Spain	1:5000
Anti-Mouse-HRP	Goat	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA	1:5000

Electronic supplementary material



Online Resource 3. Importance of the microwave irradiation in the stability of the phosphorylated AMPK forms in the cell-lysate.

N2A cells were cultured in DMEM/F-12 containing 10% FBS, 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml) and 0.5 mM glucose for 2 h. Then, the medium was removed and the cells were incubated for 2 h in a medium containing 0.5, 2.5 or 10 mM glucose. N2A cells were immediately lysed in RIPA buffer and exposed or not to microwave irradiation for 5 s, then Laemmli buffer was added and processed for western blot analysis of phospho-AMPK (Thr-172) (P-AMPK) and total AMPK (AMPK). The blots were reprobed for β-Actin. Densitometric values were normalized by β-Actin and non-phosphorylated forms. The value obtained in the cells treated with 0.5 mM glucose and exposed to microwave irradiation was taken as 1. The results are means \pm SEM; $n = 4-5$. * $P < 0.05$ 0.5 mM glucose vs 10 mM glucose, † $P < 0.05$, †† $p < 0.01$ absence of microwave vs presence of microwave.

2 ARTÍCULO 2. LA QUINASA CON DOMINIOS PAS ES UN SENSOR DE NUTRIENTES EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA E HIPOTALÁMICAS NECESARIO PARA MANTENER LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD NORMALES DE OTROS SENSORES CELULARES DE NUTRIENTES Y DE ENERGÍA

[*Mol Neurobiol* 48(3): 904-920 (2013)]

RESUMEN

La quinasa con dominios PAS (PASK) es un sensor de nutrientes altamente conservado a lo largo de la evolución. Los ratones deficientes en PASK presentan un fenotipo metabólico similar al descrito en ratones deficientes para la proteína S6K, que están protegidos contra la obesidad. Los sensores metabólicos hipotalámicos, como la proteína dependiente de AMP (AMPK) y la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR), juegan un papel importante en el comportamiento alimentario, la homeostasis del peso corporal y el balance energético. Estos sensores responden a cambios en los niveles de nutrientes en las áreas hipotalámicas involucradas en el comportamiento alimentario y en células de neuroblastoma (N2A), y hemos revelado recientemente que esos efectos son modulados por el péptido anorexigénico GLP-1 (péptido similar al glucagón 1). En este trabajo identificamos PASK tanto en las células N2A como en las áreas VMH y de LH de rata y observamos que su expresión estaba regulada por glucosa y GLP-1. Niveles elevados de glucosa disminuían la expresión de *Pask*. Además, células N2A silenciadas para la PASK mostraban una respuesta alterada de las vías de AMPK y mTOR/S6K1 a cambios en los niveles de glucosa. Asimismo, el efecto regulador del GLP-1 se encontraba bloqueado en las células silenciadas para la PASK, tanto su capacidad para modular la actividad de AMPK, S6K1 y otros intermediarios de ambas vías, como a nivel de la expresión génica. La ausencia de respuesta a bajas concentraciones de glucosa en las células silenciadas para la PASK se correlacionaba con el aumento del contenido de ATP, una baja expresión de ARNm que codifica para una de las quinasas que activa a la AMPK (LKB1) y una hiperactivación de S6K1. Nuestros resultados indican que, al menos en las células N2A, PASK es una quinasa clave en las acciones del GLP-1 y ejerce una respuesta coordinada con otros sensores metabólicos, lo que sugiere que PASK podría desempeñar un papel importante en el comportamiento alimentario.

PAS Kinase as a Nutrient Sensor in Neuroblastoma and Hypothalamic Cells Required for the Normal Expression and Activity of Other Cellular Nutrient and Energy Sensors

Verónica Hurtado-Carneiro, Isabel Roncero, Enrique Blazquez, Elvira Alvarez & Carmen Sanz

Molecular Neurobiology

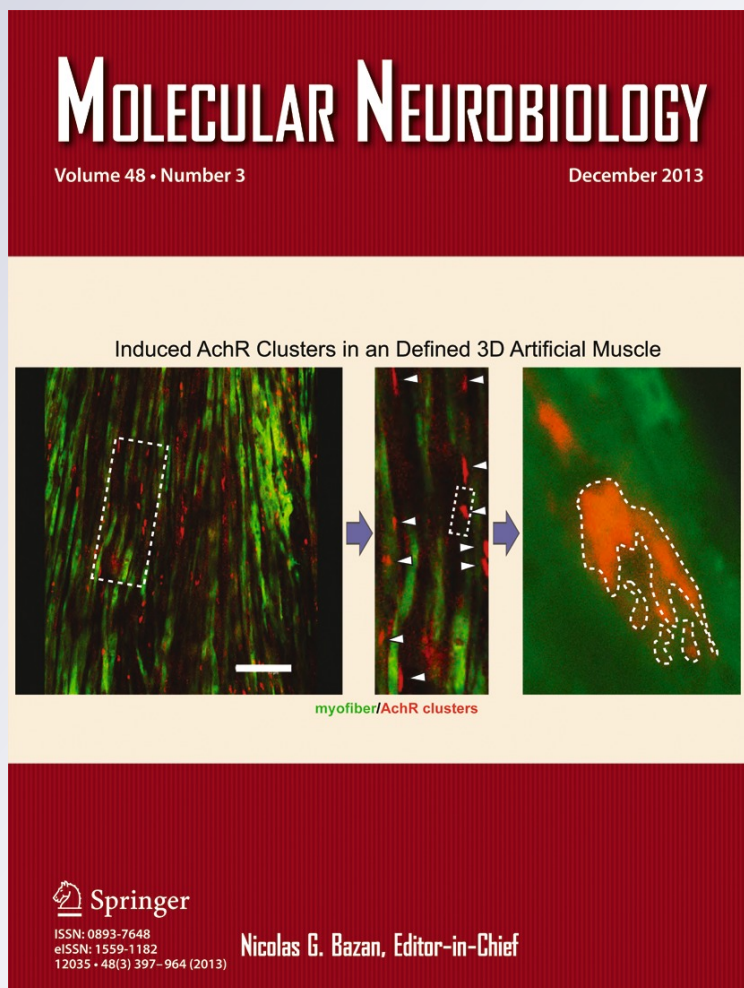
ISSN 0893-7648

Volume 48

Number 3

Mol Neurobiol (2013) 48:904-920

DOI 10.1007/s12035-013-8476-9



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

PAS Kinase as a Nutrient Sensor in Neuroblastoma and Hypothalamic Cells Required for the Normal Expression and Activity of Other Cellular Nutrient and Energy Sensors

Verónica Hurtado-Carneiro · Isabel Roncero · Enrique Blazquez · Elvira Alvarez · Carmen Sanz

Received: 11 February 2013 / Accepted: 29 May 2013 / Published online: 14 June 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract PAS kinase (PASK) is a nutrient sensor that is highly conserved throughout evolution. PASK-deficient mice reveal a metabolic phenotype similar to that described in S6 kinase-1 S6K1-deficient mice that are protected against obesity. Hypothalamic metabolic sensors, such as AMP-activated protein kinase (AMPK) and the mammalian target of rapamycin (mTOR), play an important role in feeding behavior, the homeostasis of body weight, and energy balance. These sensors respond to changes in nutrient levels in the hypothalamic areas involved in feeding behavior and in neuroblastoma N2A cells, and we have recently reported that those effects are modulated by the anorexigenic peptide

glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Here, we identified PASK in both N2A cells and rat VMH and LH areas and found that its expression is regulated by glucose and GLP-1. High levels of glucose decreased Pask gene expression. Furthermore, PASK-silenced N2A cells record an impaired response by the AMPK and mTOR/S6K1 pathways to changes in glucose levels. Likewise, GLP-1 effect on the activity of AMPK, S6K1, and other intermediaries of both pathways and the regulatory role at the level of gene expression were also blocked in PASK-silenced cells. The absence of response to low glucose concentrations in PASK-silenced cells correlates with increased ATP content, low expression of mRNA coding for AMPK upstream kinase LKB1, and enhanced activation of S6K1. Our findings indicate that, at least in N2A cells, PASK is a key kinase in GLP-1 actions and exerts a coordinated response with the other metabolic sensors, suggesting that PASK might play an important role in feeding behavior.

Elvira Alvarez and Carmen Sanz contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12035-013-8476-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. Hurtado-Carneiro · I. Roncero · E. Blazquez · E. Alvarez · C. Sanz

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Ciudad Universitaria, sn, 28040 Madrid, Spain

V. Hurtado-Carneiro · I. Roncero · E. Blazquez · E. Alvarez · C. Sanz

The Center for Biomedical Research in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Madrid, Spain

C. Sanz

Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

E. Alvarez (✉)

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Plaza S. Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid, Spain
e-mail: eao513@med.ucm.es

Keywords AMPK · Antidiabetogenic agents · Feeding behavior · GLP-1 · Hypothalamus · mTOR/S6K · Obesity

Introduction

The PAS kinase (PASK), also termed PASKIN, has a serine/threonine kinase catalytic domain and a PAS domain designed to detect environmental parameters, such as light, oxygen, and redox state. In mammals, it has been proposed that PASK is activated by a small metabolite and may regulate glycogen synthesis and protein translation. PASK is also a nutrient sensor conserved from yeast to humans [1–3] with its role being compared to other metabolic sensors: AMP-activated protein kinase (AMPK) and the mammalian target

of rapamycin (mTOR). AMPK activity is regulated by fluctuations in cellular energy produced by nutritional state or by metabolic stress that reduces ATP production. The activation of AMPK occurs with a high AMP/ATP ratio in low energy states. Once activated, the AMPK will contribute to restore the energy balance [4–6]. By contrast, mTOR and its downstream target, the S6 Kinase 1 (S6K1), respond to nutrients and hormonal signals [7–9]. mTOR complex 1 (mTORC1) is rapamycin and nutrient sensitive. Thus, mTOR is stimulated by an abundance of nutrients and hormones promoting anabolic processes and cell growth [10, 11]. Both AMPK and mTOR respond to changes in glucose and other nutrients in a coordinated way and in opposite directions. Therefore, low energy conditions activate AMPK, which mediates the phosphorylation of the tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and the concomitant inhibition of mTOR [12]. Furthermore, AMPK phosphorylates raptor (rapamycin-sensitive adaptor protein of mTOR) in mTORC1, downregulating this complex [13].

It has been reported that PASK expression is regulated by glucose, being increased at high glucose concentration, which also activates PASK post-translationally in Min-6 cells [14]. In contrast, PASK regulation by glucose was not observed in pancreatic beta-cells from PASKIN knockout and wild-type mice, and glucose-stimulated insulin release was also similar in both types of mice [15].

An initial characterization of PASK-deficient mice showed no abnormalities in development, growth, or reproductive functions [16]. Subsequent studies showed that PASK-deficient mice are resistant to diet-induced obesity and that protection seems to be caused by a high metabolic rate in skeletal muscle; these effects were not related to changes in AMPK and S6K1 activation levels [17]. Additionally, the PASK knockdown effect was also observed in cultured myoblasts, which also registered an increase in the oxidation of glucose and palmitate accompanied by elevated cellular ATP levels [17].

In mammals, PASK is thought to be involved in the regulation of glucose and energy metabolism homeostasis, as reviewed by [3, 18, 19]. The effects of PASK activation have also been reported to be tissue specific [17]. Likewise, studies in recent years have established a direct relationship between the activity of the metabolic sensors in the hypothalamus and the regulation of food intake, body weight, and energy homeostasis. Moreover, the function of hypothalamic metabolic sensors is modulated by anorexigenic and orexigenic peptides. We have recently reported that the metabolic sensors in hypothalamic areas and in the neuroblastoma N2A cell line responded to glucose and the anorexigenic peptide glucagon-like peptide 1 (GLP-1), which is also used as an antidiabetogenic agent [20, 21]. In addition, the AMPK and mTOR/S6K pathways respond to changes in glucose concentrations, and GLP-1 treatment reversed the glucose effects [22]. PASK is also expressed

in hypothalamic areas and in neuroblastoma N2A cells; hence, we studied the glucose and GLP-1 effect on PASK expression and whether there is a coordinated response by metabolic sensors at different glucose concentrations. Accordingly, we investigated the effect of PASK silencing on the expression of several genes, as well as the metabolic effects on the expression and activity of AMPK and mTOR/S6K1 pathways in neuroblastoma cells.

Materials and Methods

Experimental Animals

All the procedures involving animals were approved by the appropriate Institutional Review Committee and met the guidelines for the care of animals specified by the European Community. Same-aged male Wistar rats weighing 200–250 g were fed ad libitum with a standard pellet diet and housed at a constant temperature (21 °C) on a 12-h light–dark cycle, with lights on at 0800 hours.

Cell Cultures

Mouse neuroblastoma N2A cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) containing 4.5 g/L glucose and supplemented with 10 % FBS, 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 mg/ml). The cells were maintained in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ at 37 °C. Only the cells propagating for less than eight passages were used in the experiments.

In Situ Hybridization Histochemistry

The histological examination was conducted using 20 µm of frozen rat brain slices. In situ hybridization was performed as described by [23] using digoxigenin-labeled cRNA probes. Single-stranded Pask RNA sense or antisense probes were prepared by the transcription of a fragment of 1,180 pb previously amplified by PCR using the universal forward primers pUC/M13 (5'-GTTTTCAGTCACGAC-3') and reverse primers (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). T7 and SP6 RNA polymerases (Roche; Promega, Southampton, UK) were used for preparing antisense and sense probes, respectively. Tissues were incubated with RNA probes at 1 µg/ml concentration in a hybridization mix [50 % formamide, 1.3× SSC (pH 4.5), 5 mM EDTA, 50 µg/ml yeast RNA, 0.2 % Tween 20, 0.5 % CHAPS, and 100 µg/ml heparin]. To elicit color, the slices were incubated with a 1/2,000 dilution of anti-digoxigenin-alkaline phosphatase antibody (Roche) and developed with 0.26 mg/ml nitroblue tetrazolium salt and 0.175 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate prepared in NTMT (100 mM NaCl,

100 mM Tris–HCl pH 9.5, 50 mM MgCl₂, and 0.1 % Tween 20). Images were taken with a Leica DM RB microscope.

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was developed as described [24]. Briefly, cells were grown attached to glass coverslips of 12 mm in diameter. The cells were then fixed for 15 min at 4 °C in 4 % paraformaldehyde and washed three times with PBS at room temperature. The cells were permeabilized for 20 min with PBS 0.4 % (v/v) Triton X-100, and non-specific antibody binding sites were blocked by incubation with a blocking solution (PBS, 10 % goat serum, 0.1 % Triton X-100) for 1 h. The cells were incubated with anti-PASK antibody diluted 1:100 in the blocking solution and then washed twice for 10 min with PBS at room temperature. For fluorescence detection, the cells were incubated with Texas Red conjugated donkey anti-rabbit antibody (GeneTex, Inc., San Antonio, CA, USA) diluted 1:200 in the blocking solution. In all cases, the specificity of immunodetection was confirmed by not adding a primary antibody. The nucleus DNA was stained by adding 1 µg/ml of 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in PBS. Finally, the cells were mounted with the Fluoromount-G slide mounting medium (EMS, Hatfield, PA, USA). The images were taken with a TCS SP2 confocal laser microscopy system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with an inverted DMIRE2 Leica microscope. Confocal fluorescence images were analyzed using LCS Lite software from Leica.

Procedure for Hypothalamic Slice Explant Cultures

Hypothalamic slices were obtained as described previously [25]. Briefly, male Wistar rats were decapitated, and the brains were quickly removed and immersed in a cold (4 °C) MEM medium containing 25 mM HEPES, 20 % heat-inactivated horse serum, 4 mM glutamine, 6.5 mg/ml glucose, and 100 U/ml penicillin–streptomycin. The hypothalami were removed from the brain, and sections of 300-µm thickness were cut on a McIlwain tissue chopper (Mickle Laboratory Engineering, Surrey, UK). The slices were cultured at 37 °C in an atmosphere containing 5 % CO₂ for 5 h in MEM supplemented with 25 mM HEPES and Hank's salt enriched with the above components in order to stabilize the cultures. The slices were then incubated in a medium containing 2 % FBS and 5.5 mM glucose for 16 h. Following this, the hypothalamic slices were fasted at 0.5 mM glucose for 2 h. The medium was removed, and the slices were incubated for 3 h with 1, 2.5, or 10 mM glucose, in some cases adding 10 nM GLP-1. At the end of the incubations, special care was taken to identify and isolate the VMH and LH areas by micropunching according to the stereotaxic coordinates [26].

RNA Interference

The short interference RNA (siRNA) targeting Pask gene (PASK Silencer® Select Pre-design siRNA) and the negative control siRNA (Silencer® Select Negative Control siRNA) were obtained from Ambion (Life Technologies). The sequences of Pask siRNA were: Sense CGUGUAAUCUGCAUCAGGAtt and Antisense UCCUGAUGCAGAUUACACGtg. N2A cells were grown up to a 50 % confluence in six-well plates. siRNA was transfected by using Lipofectamine™ with 0.15 µg of Pask or 10 nM control siRNAs, according to the manufacturer's protocol. After 24 h, the cells were starved of serum (0.1 %) and glucose (0.5 mM) for 2 h. They were then incubated in a medium containing either 0.5, 2.5, or 10 mM of glucose for 3 h. In some cases, 10 nM GLP-1 was added during the incubation. Cell lysates were collected and processed for Western blot analysis or RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR.

Real-time Polymerase Chain Reaction (TaqMan® Assay)

The total RNA from N2A cells or rat hypothalamic slices was isolated by the acid guanidinium isothiocyanate method [27]. RNA integrity was tested with the Bioanalyzer 2100 (Agilent), and cDNA synthesis was developed with the “high-capacity cDNA archive kit” (Applied Biosystems), using 1 µg of RNA as template, following the manufacturer's instructions. The mRNA levels of Pask, Ampkα2, Glp-1r, β-actin, RN18s, Sf-1, and Prepro-orexin were measured by real-time quantitative RT-PCR using TaqMan® probes (Applied Biosystems). The primers and probes (Online Resource 1) were designed with Primer Express 2.0 software from Applied Biosystems.

Multiple Gene Expression Analyses in a TaqMan® Gene Expression Assay

RNA integrity was tested with the Bioanalyzer 2100 (Agilent), and cDNA synthesis was developed with the “high-capacity cDNA archive kit” (Applied Biosystems) using 1 µg of RNA as template in a final volume of 20 µl, following the manufacturer's instructions.

Multiple gene expression analyses were conducted by quantity real-time PCR, using the TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Roche Diagnostic) on a TaqMan® Array Fast 96-well plate containing 18 customized duplicated genes (Online Resource 2). Two microlitres of a 1/10 dilution of the cDNA was used as a template for the PCR developed in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

The conditions were 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Two housekeeping genes were used for the normalization

Table 1 Inhibitors of protein kinases and phosphatases

Inhibitors		Manufacturer	Concentration
PKA inhibitor	KT5720	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	200 nM
PKC inhibitor	Ro-318220	Bionova Cientifica, Madrid, Spain	10 mM
PI3K inhibitor	LY294002	Bionova Cientifica, Madrid, Spain	10 mM
MEK inhibitor	PD 98059	Calbiochem, Darmstadt, Alemania	2 mM
mTOR inhibitor	Rapamycin	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	100 nM
Phosphatases inhibitors: PP2B and PP1	Okadaic Acid Sodium Salt	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	10 mM and 20 nM
CaMK inhibitor	KN62	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	3 mM
CaMKK inhibitor	STO-609	Sigma Aldrich, Madrid, Spain	5 mM

procedure, namely, 18 s and β -actin. The data were analyzed with RQ Manager Software (Applied Biosystems). The average 18 s or β -actin CT values on each 96-well plate were then subtracted from the CT value for each reaction well on that plate.

Protein Expression and Activity of PASK, AMPK, and mTOR/S6K1 Pathways

For the analysis of protein expression and activity by Western blot, the cells were cultured for 2 h in the presence of 0.5 mM of glucose. They were then incubated in a medium containing 0.5, 2.5, or 10 mM of glucose for 2, 4, 5, 8, 16 h. The cells were occasionally incubated in the presence or absence of different protein kinase or phosphatase inhibitors at the concentrations described in Table 1 for 30 min. To analyze the effect of AMPK activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside (AICAR) cells were treated with

2 mM AICAR for 1 h. In the case of the activity study, 10 nM GLP-1 was added during the last 10 min of the incubation, while in the protein expression determination, the GLP-1 was added from the beginning of the incubation with glucose. The cells were immediately lysed in a RIPA buffer and exposed to microwave irradiation for 5 s. Total and activated forms were detected by Western blot using the antibodies described in Table 2. The blots were reprobed for β -actin. Finally, the blots were scanned and quantified using Quantity One software (Bio-Rad, GS800 Densitometer).

ATP Concentration

Total cellular ATP concentration was measured using the luciferase bioassay. The bioluminescence assay is based on the reaction of ATP with recombinant firefly luciferase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and its substrate luciferin (Sigma). Cells were grown on a 24-well plate. Both

Table 2 Antibodies and conditions used for Western blot assays

Antibody	Host	Manufacturer	Dilution used
Anti-ACC	Rabbit	Millipore Iberica, Madrid, Spain	1:1,000
Anti-phospho-ACC (Ser 79)	Rabbit	Millipore Iberica, Madrid, Spain	1:500
Anti-AKT	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1,000
Anti-phospho-AKT (Ser 473)	Mouse	Millipore Iberica, Madrid, Spain	1:1,000
Anti-AMPK α	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1,000
Anti-phospho-AMPK α (Thr172)	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1,000
Anti- β -actin	Mouse	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA	1:5,000
Anti CaMKK β	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	1:1,000
Anti LKB-1	Mouse	Abcam, Cambridge, UK	1:100
Anti-PGC-1 α	Mouse	Millipore Iberica, Madrid, Spain	1:1,000
Anti-S6K1	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1,000
Anti-phospho-S6K1(Thr389)	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1,000
Anti-PASK	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1,000
Anti-PTEN	Rabbit	Millipore Iberica, Madrid, Spain	1:1,000
Anti-Rabbit-HRP	Goat	Millipore Iberica, Madrid, Spain	1:5,000
Anti-Mouse-HRP	Goat	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA	1:5,000

the cells previously transfected with negative control siRNA and those with Pask siRNA were incubated for 2 h in 0.5 mM glucose and then for a further 2 h in a medium containing either 0.5 or 10 mM of glucose. A 1/1,000 dilution of grown cells was harvested by trypsinization and centrifugation in PBS. Pellets were lysed in 20 μ l of 1.35 M perchloric acid and then neutralized with 15 μ l of 2.8 M KHCO_3 –0.1 M Tris. Ten microliters of the supernatant was used for the luciferase reaction, by adding 10 μ l of luciferase

and 100 μ l luciferin. Luminescence was determined in a luminometer (BG-P luminometer; GEM Biomedical, Hamden, CT).

Statistical Analyses

All values are presented as means \pm SEM. Groups were compared using *t* test analysis. $P<0.05$ was considered statistically significant.

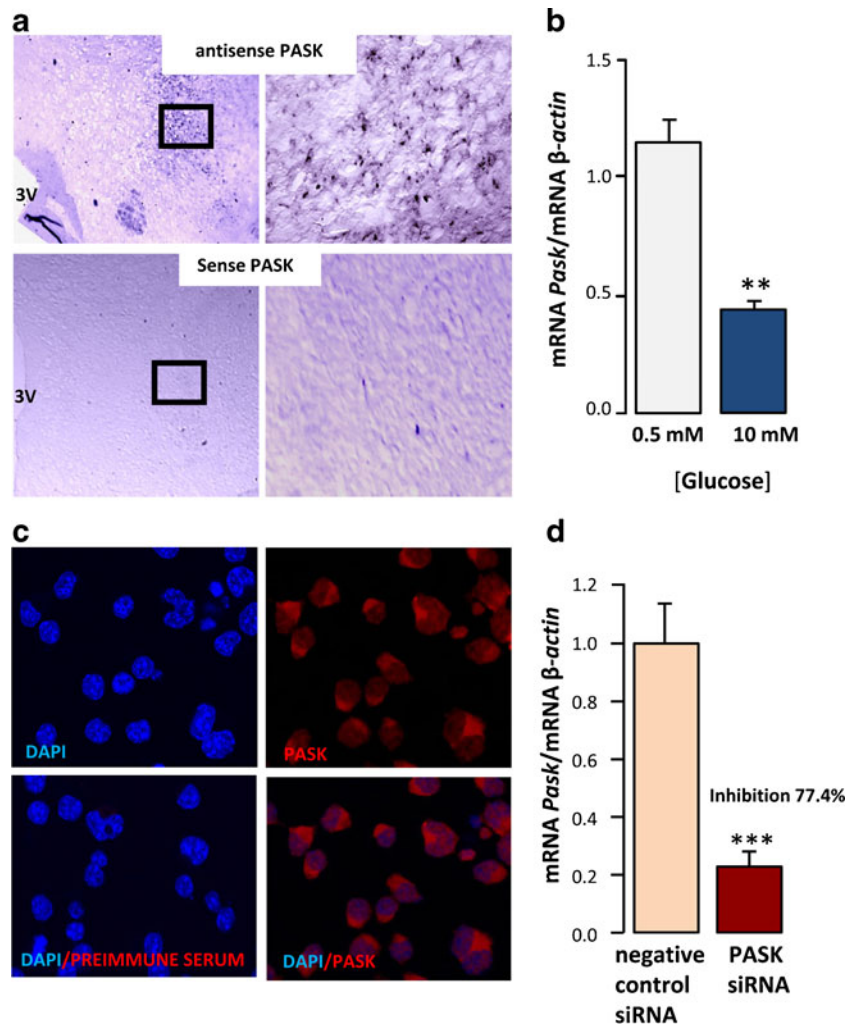
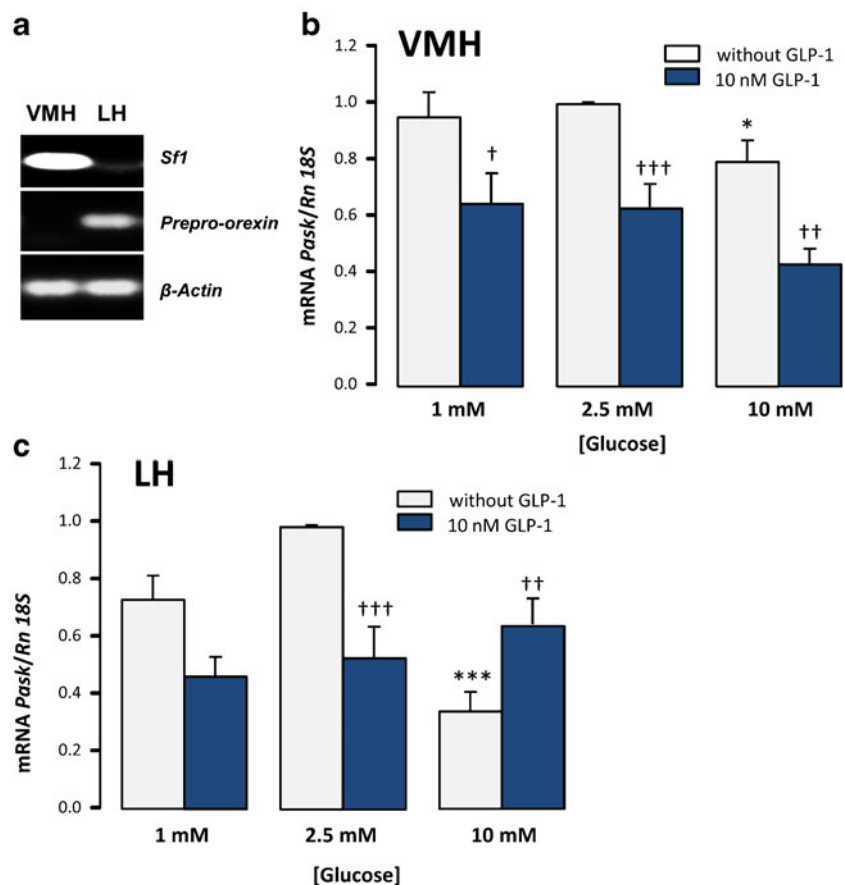


Fig. 1 PASK is expressed in the rat hypothalamus and neuroblastoma cells. Pask mRNA expression is regulated by glucose and siRNA targeting Pask gene. **a** In situ hybridization to detect the expression of Pask mRNA in the hypothalamus. The photomicrographs are of 20- μ m sections of rat brain showing the third ventricle (3 V) and the hemi-hypothalamus. The sections were processed for in situ hybridization with a digoxigenin-labeled Pask RNA antisense probe (*upper panels*) or sense probe (*bottom panels*). The *right panels* show a higher magnification of the squared area corresponding to the LH. The photomicrographs correspond to two independent experiments. **b** Immunocytochemistry of PASK in N2A cells. N2A fixed cells were incubated in the presence of either an anti-PASK antibody or a preimmune serum (immunostaining negative control). PASK location was visualized in red (Texas Red coupled to a secondary antibody). Nuclei were stained with

DAPI (blue fluorescence). **c** Pask mRNA levels in N2A cells treated for 3 h in a medium that contained 0.5 or 10 mM glucose, quantified by real-time RT-PCR and normalized to β -actin mRNA levels. The *bars* represent the mean \pm SEM of five experiments performed in duplicate. The values are relative to the data obtained at 0.5 mM glucose that was considered as 1. $**P<0.01$ 10 mM glucose vs. 0.5 mM glucose treatment. **d** Inhibition of Pask mRNA in PASK-silenced neuroblastoma N2A cells. *Bars* represent the mean \pm SEM ($n=5$) of Pask mRNA levels normalized to β -actin in cells transfected with siRNA targeting Pask gene (PASK siRNA) or negative control siRNA (negative control siRNA). The values are relative to the data obtained in cells transfected with negative control siRNA that was considered as 1. $***P<0.001$ PASK siRNA vs. negative control siRNA

Fig. 2 Glucose and GLP-1 modulate Pask gene expression in the VMH and LH areas. Organotypic hypothalamic slices of 300 μ m were glucose-starved for 2 h and then cultured for 3 h in a medium containing 1, 2.5, or 10 mmol/l glucose in the presence or absence of 10 nM GLP-1. The VMH and LH areas were dissected from slices by micropunching. **a** RT-PCR analysis of Sf-1, prepro-orexin, and β -actin mRNA expression in the VMH and LH. **b, c** Pask mRNA was quantified by real-time RT-PCR analysis. Bars represent Pask mRNA levels normalized by RNA 18s and referred to the value obtained under the 2.5-mM glucose condition in the absence of GLP-1, considered as 1. Data are expressed as means \pm SEM; $n=4$ –5 independent experiments performed in duplicate. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 10 mM glucose vs. 2.5 mM glucose; $^{\dagger}P<0.05$, $^{\dagger\dagger}P<0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P<0.001$ absence of GLP-1 vs. the presence of 10 nM GLP-1



Results

Expression of Pask mRNA in the Hypothalamus

By means of in situ hybridization with the specific antisense Pask probe, labeled cells were found throughout the hypothalamus, whereas no labeling was detected with the sense probe (Fig. 1a). Cells positive for Pask mRNA were found to be distributed throughout the hypothalamus. A higher magnification of the labeled cells in the LH is shown in Fig. 1a. The specificity of the probe and the in situ hybridization background were tested with the sense probe where no labeled cells were found.

Cellular Location of PASK

PASK immunocytochemistry was developed in neuroblastoma N2A cells. All the N2A cells contained PASK protein, and it was present mainly in the cell cytoplasm (Fig. 1b).

PASK Responds to Glucose in Neuroblastoma Cells

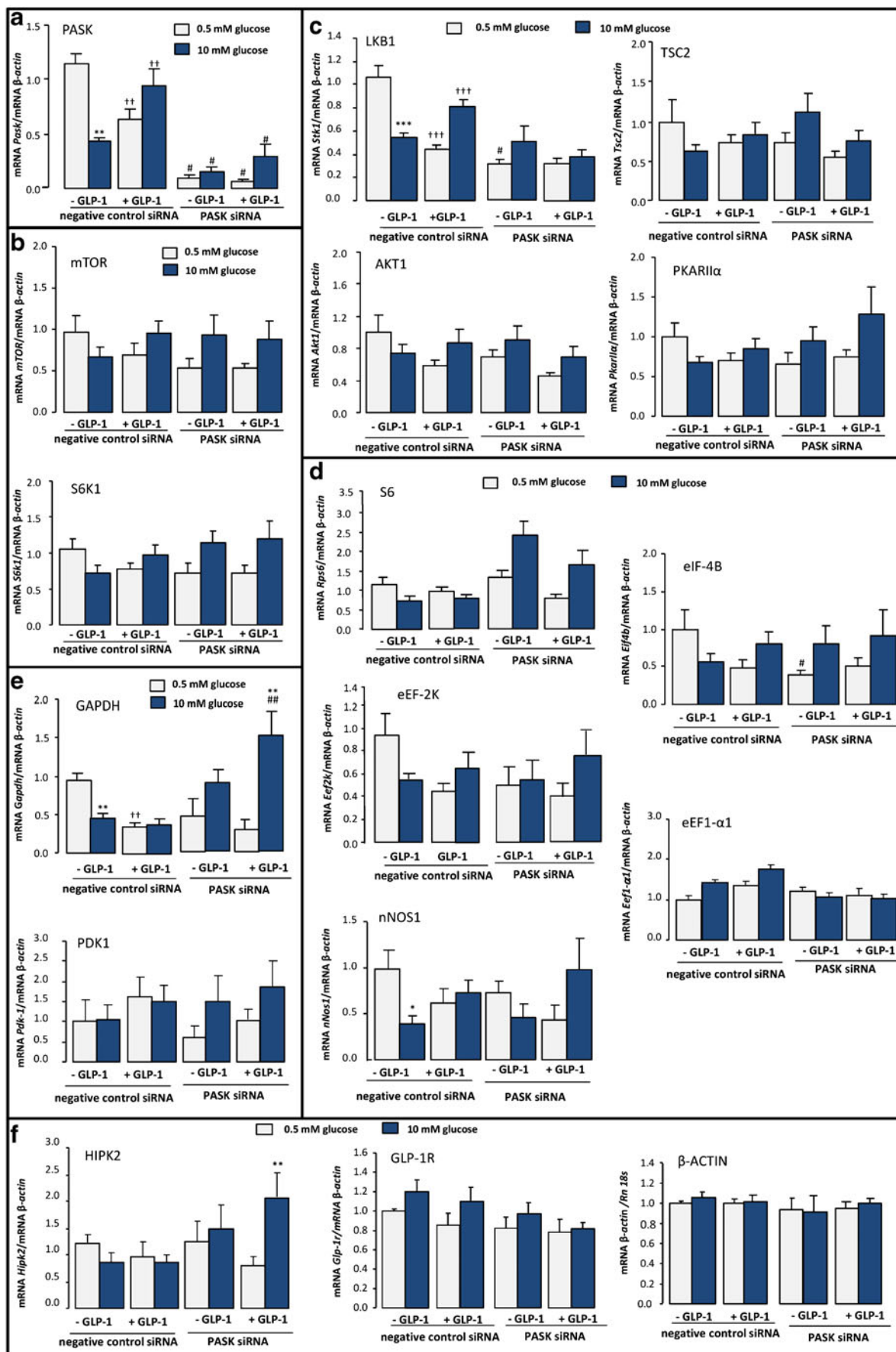
PASK is expressed in N2A cells. The Pask mRNA expression was measured with real-time RT-PCR after treatment at low and

high glucose concentrations (0.5 or 10 mM). Elevated levels of glucose decreased the amount of mRNA coding PASK in neuroblastoma cells (Fig. 1c).

Glucose and GLP-1 Regulate PASK Expression in Hypothalamic Slice Explants

We then investigated Pask mRNA expression in the hypothalamic areas involved in the control of feeding: ventromedial hypothalamus (VMH) and in the lateral hypothalamic area (LH). In order to ensure the purity of these hypothalamic nuclei obtained by micropunching from hypothalamic slice explants, steroidogenic factor 1 (SF-1) and prepro-orexin genes were used as markers of these specific nuclei, respectively.

Fig. 3 Effects of PASK knockdown on the expression of several genes in neuroblastoma cells. PASK knockdown N2A and control cells were serum-starved for 2 h and then incubated in a medium containing either 0.5 or 10 mM of glucose for 3 h in the presence or absence of 10 nM GLP-1. Quantity real-time PCR was used to analyze the expression of several genes as shown in Online Resource 1. The mRNA levels of the different genes were normalized by mRNA of β -actin used as house-keeping gene. The value obtained at 0.5 mM glucose without GLP-1 was taken as 1. Results are means \pm SEM; $n=4$ –5. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 10 mM glucose vs. 0.5 mM glucose; $^{\dagger}P<0.01$, $^{\dagger\dagger}P<0.001$ absence of GLP-1 vs. the presence of 10 nM GLP-1; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ PASK siRNA vs. negative control siRNA



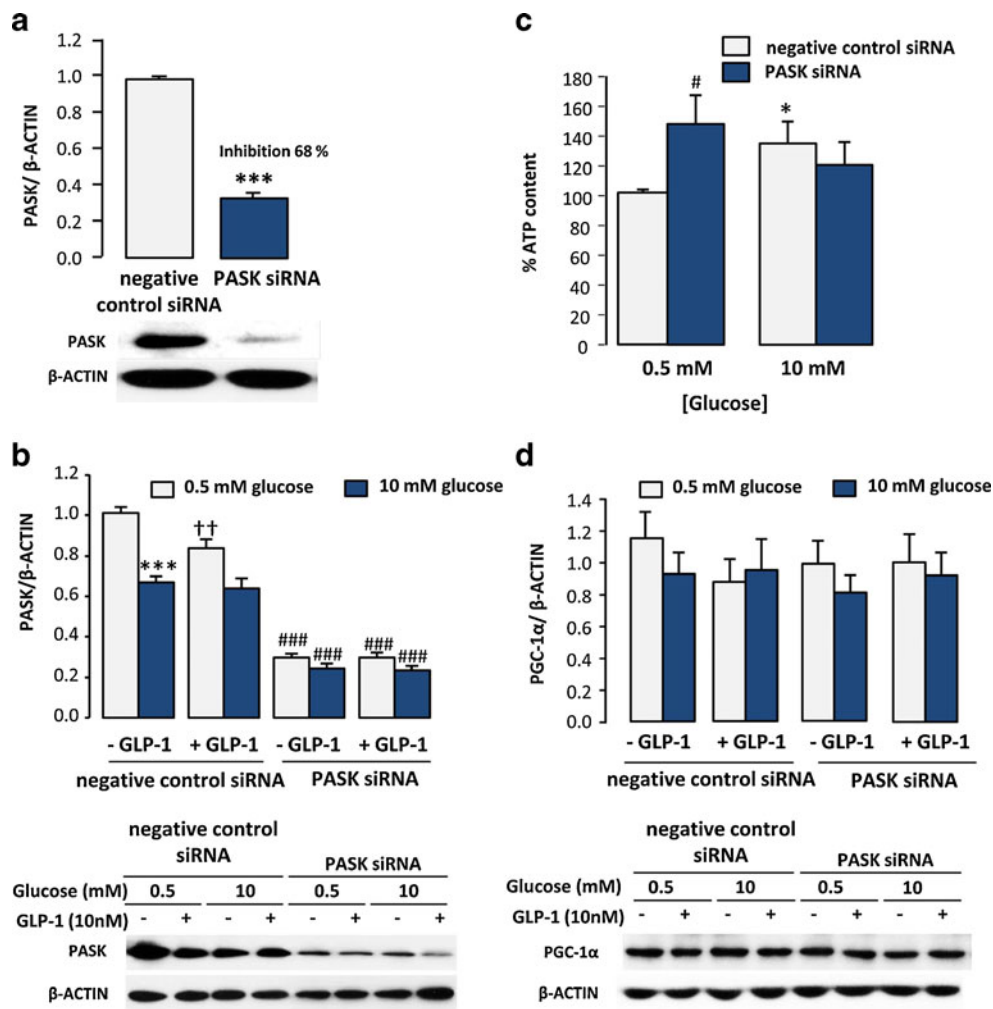


Fig. 4 Effects of glucose and GLP-1 on the expression of PASK, PGC-1α, and on the ATP content in Pask gene knockdown neuroblastoma cells. PASK knockdown N2A (PASK siRNA) and control cells (negative control siRNA) were serum-starved for 2 h and then incubated in a medium containing either 0.5 or 10 mM of glucose in the presence or absence of 10 nM GLP-1 for 5, 16 h. Neuroblastoma cells were immediately lysed in RIPA buffer and exposed to microwave irradiation for 5 s, after which they were processed for Western blot analysis. The blots were reprobbed for β-actin to normalize the results (**a**, **b**, **d**). **a** Inhibition of PASK protein expression in PASK knockdown cells. Immunoblot analysis of PASK. Bar graphs represent the densitometric values, normalized by β-actin. The results are means±SEM; $n=3-4$. **b**, **d** Glucose and GLP-1 effect in PASK and PGC-1α expression.

Immunoblot analysis of PASK (16 h) (**b**) or PGC-1α (5 h) (**d**). The value of negative control siRNA at 0.5 mM glucose without GLP-1 was taken as 1. *** $P<0.001$ 10 mM glucose vs. 0.5 mM glucose; †† $P<0.01$ absence of GLP-1 vs. the presence of 10 nM GLP-1; ### $P<0.001$ PASK siRNA vs. negative control siRNA. The bottom panels correspond to representative Western blots of the data indicated in the graphs (**a**, **b**, **d**). **c** Cellular ATP content normalized by milligrams of total protein in cell extracts treated for 2 h with different glucose concentrations. Bars represent the means±SEM of five experiments developed in duplicate. The results are expressed as a percentage of negative control siRNA at 0.5 mM glucose that was considered 100 % * $P<0.05$ 10 mM glucose vs. 0.5 mM glucose; # $P<0.05$ PASK siRNA vs. negative control siRNA

The mRNA encoding SF-1 was mostly present in VMH, while on the contrary prepro-orexin, gene expression was highest in LH (Fig. 2a).

The mRNA levels of Pask were measured with real-time RT-PCR in VMH and LH areas from rat hypothalamic slice explants after treatment with different glucose concentrations (1, 2.5, or 10 mM; Fig. 2b, c). Higher glucose concentrations (10 mM) decreased by ≈20 and 66 %, the expression of the mRNA coding PASK in the VMH and LH areas, respectively. The presence of GLP-

1 decreased Pask mRNA and reversed in part the high glucose concentrations effect in the LH (Fig. 2b, c).

PASK Silencing in Neuroblastoma N2A Cells

We therefore analyzed the effect of PASK knockdown in neuroblastoma N2A cells. We have previously reported that both AMPK and S6K1 activities respond to glucose concentrations, and GLP-1 also significantly decreased AMPK and S6K1 activation in these cells [22]. PASK-silenced cells

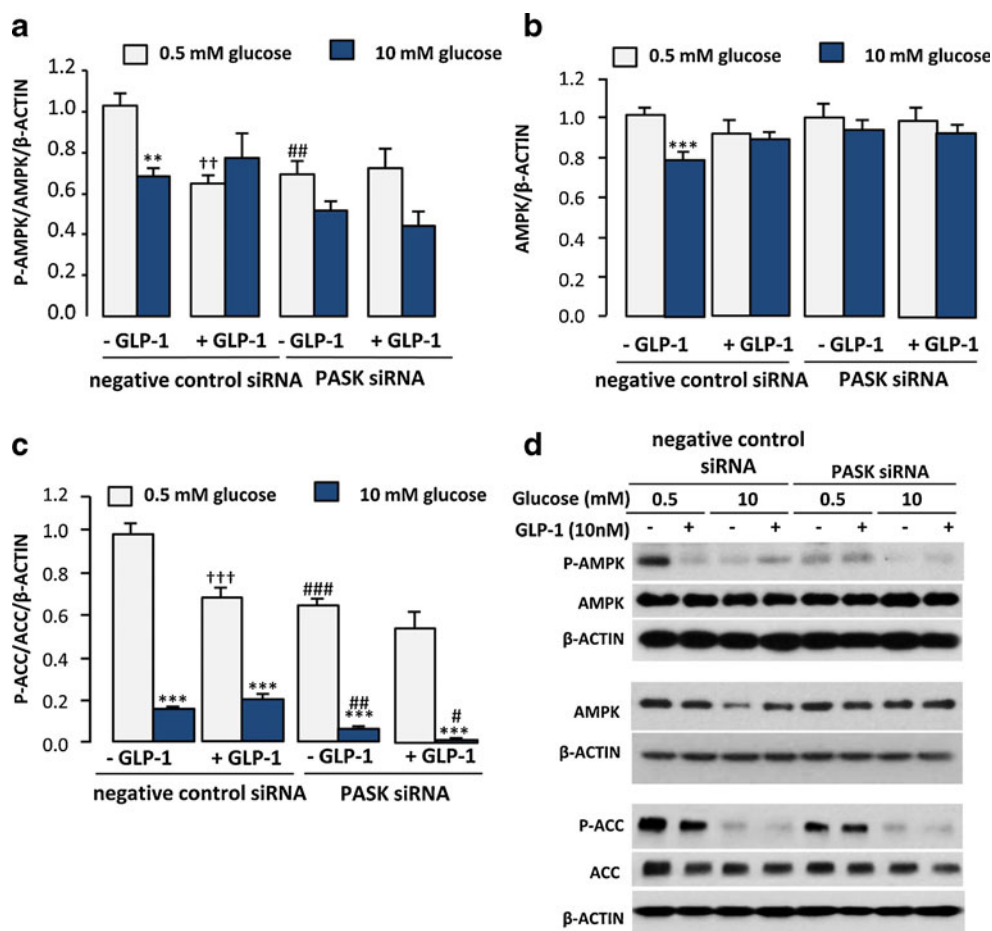


Fig. 5 Impaired effects of glucose and GLP-1 on the expression and activation of AMPK and ACC in Pask gene knockdown neuroblastoma cells. PASK knockdown N2A (PASK siRNA) and control cells (negative control siRNA) were serum-starved for 2 h and then incubated in a medium containing either 0.5 or 10 mM of glucose for 2 h with the presence of 10 nM during the last 10 min, in the case of activity determination (**a**, **c**, and **d**). On the other hand, total protein valuation was performed in cells incubated with different glucose concentrations and in the presence or absence of 10 nM GLP-1 for 5 h (**b**). Neuroblastoma cells were immediately lysed in a RIPA buffer and exposed to microwave irradiation for 5 s, after which they were processed for Western blot analysis of phospho-

AMPK (Thr-172) (P-AMPK) (**a**, **d**) and total AMPK (AMPK) (**b**, **d**) and of phospho-ACC (Ser-79) (P-ACC) and total ACC (ACC) (**c**, **d**). The blots were reprobated for β-actin to normalize the results. Bar graphs represent means±SEM; *n*=3–4 of the densitometric values, normalized by β-actin and by non-phosphorylated forms. Panel **d** shows representative Western blots of the graphs **a**, **b**, and **c**, respectively. The value of negative control siRNA at 0.5 mM glucose without GLP-1 was taken as 1. ***P*<0.01, ****P*<0.001 10 mM glucose vs. 0.5 mM glucose; ††*P*<0.01, †††*P*<0.001 absence of GLP-1 vs. the presence of 10 nM GLP-1; #*P*<0.05, ###*P*<0.01, ####*P*<0.001 PASK siRNA vs. negative control siRNA

recorded a 77 % decrease in PASK mRNA compared to siRNA negative control (Fig. 1d).

We then compared the expression of several genes using real-time RT-PCR in PASK knockdown N2A and control cells at low or high glucose concentrations in the presence or absence of GLP-1. Thus, we analyzed the expression of mRNAs coding to PASK and other metabolic sensors as: AMPKα2, mTOR/S6K1; several genes of proteins that could regulate the metabolic sensors activity: LKB1, TSC2, AKT, PKA; as well as some direct substrates of metabolic sensors: S6, eIF-4B, eEF-2K, eEF1-α1, and nNOS; genes coding to protein decisive for carbohydrate metabolism: GAPDH and PDK1; additionally, genes coding to HIPK2, which was reported to mediate

apoptosis in neurons, GLP-1 receptor (GLP-1R) and a house-keeping gene: β-actin used for the normalization procedure. The Pask mRNA level was higher at low glucose concentration and lower at high glucose, and the treatment with GLP-1 reversed these effects. However, the expression of Pask did not respond to glucose or GLP-1 after PASK silencing (Fig. 3a). PASK knockdown did not change significantly the expression of mRNAs coding to mTOR and S6K1 (Fig. 3b). Unfortunately, it was impossible to detect the mRNA level of Ampkα2 in these cells with the probes used. A similar pattern of expression was observed in PASK-silenced and control cells for the genes coding to AKT, PKARIIα, and TSC2 (Fig. 3c). However, the expression of Stk1 mRNAs that codify to LKB1, one of the

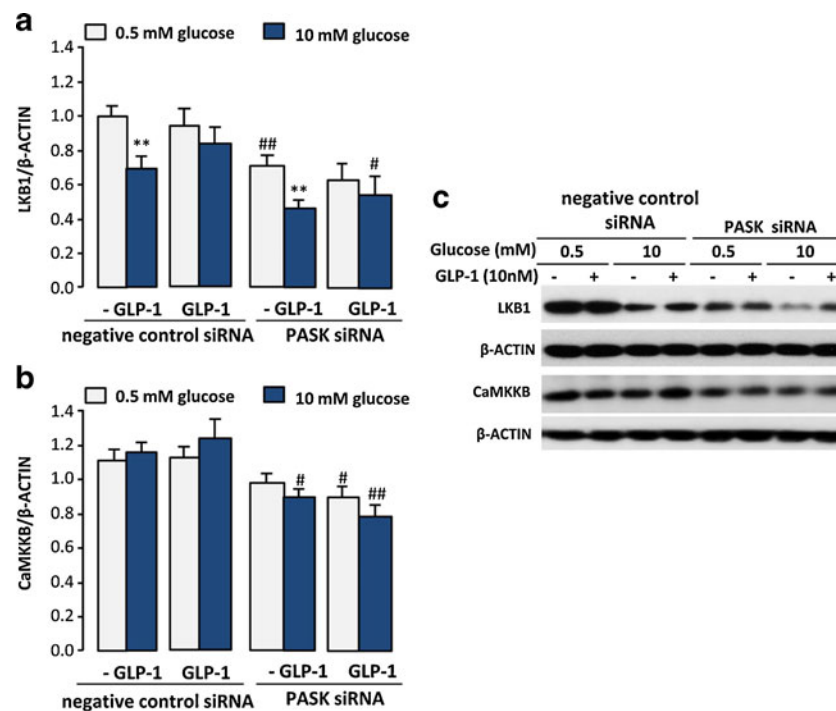


Fig. 6 Impaired effects of glucose and GLP-1 on the expression of LKB1 and CaMKKβ in *Pask* gene knockdown neuroblastoma cells. PASK knockdown N2A (PASK siRNA) and control cells (negative control siRNA) were serum-starved for 2 h and then incubated in a medium containing either 0.5 or 10 mM of glucose for 5 h. In some cases, 10 nM GLP-1 was added during the incubation. Neuroblastoma cells were immediately lysed in a RIPA buffer and exposed to microwave irradiation for 5 s, after which they were processed for Western

blot analysis of LKB1 (LKB1) (a, c) and CaMKKβ (CaMKKβ) (b, c). The blots were reprobed for β-actin. Bar graphs represent the densitometric values, normalized by β-actin. The results are means±SEM; $n=3-4$. Panel c shows representative Western blots of graphs (a) and (b), respectively. The value of negative control siRNA at 0.5 mM glucose without GLP-1 was taken as 1. ** $P<0.01$ 10 mM glucose vs. 0.5 mM glucose; # $P<0.05$; ## $P<0.01$ PASK siRNA vs. negative control siRNA

upstream kinases of AMPK, was enhanced at low glucose concentration, and the presence of GLP-1 reversed the glucose effect, with PASK knockdown impairing both effects (Fig. 3c). The expression of nNos1 gene responded to glucose levels, being the lower expression observed at high glucose concentration (Fig. 3d). Additionally, we found that Eif4B gene that codifies to translation initiation factor 4B was downregulated in PASK knockdown cells (Fig. 3d). The PASK knockdown blocked the glucose response of nNos1 genes (Fig. 3d). The expression of Gapdh gene was increased at low glucose concentration, and the presence of GLP-1 reversed the low glucose effect, and PASK knockdown impaired the glucose effect (Fig. 3e).

PASK Silencing in Neuroblastoma N2A Cells Increases Levels of ATP at Low Glucose Concentrations

The reduced *Pask* mRNA levels in silenced N2A cells (Fig. 1d) produced eventual reduction in PASK protein of ~68 % (Fig. 4a). Treatment of 16 h with high glucose concentration (10 mM) or 10 nM GLP-1 reduced PASK protein levels in N2A cells relative to the cultured in 0.5 mM glucose (Fig. 4b). Both glucose and

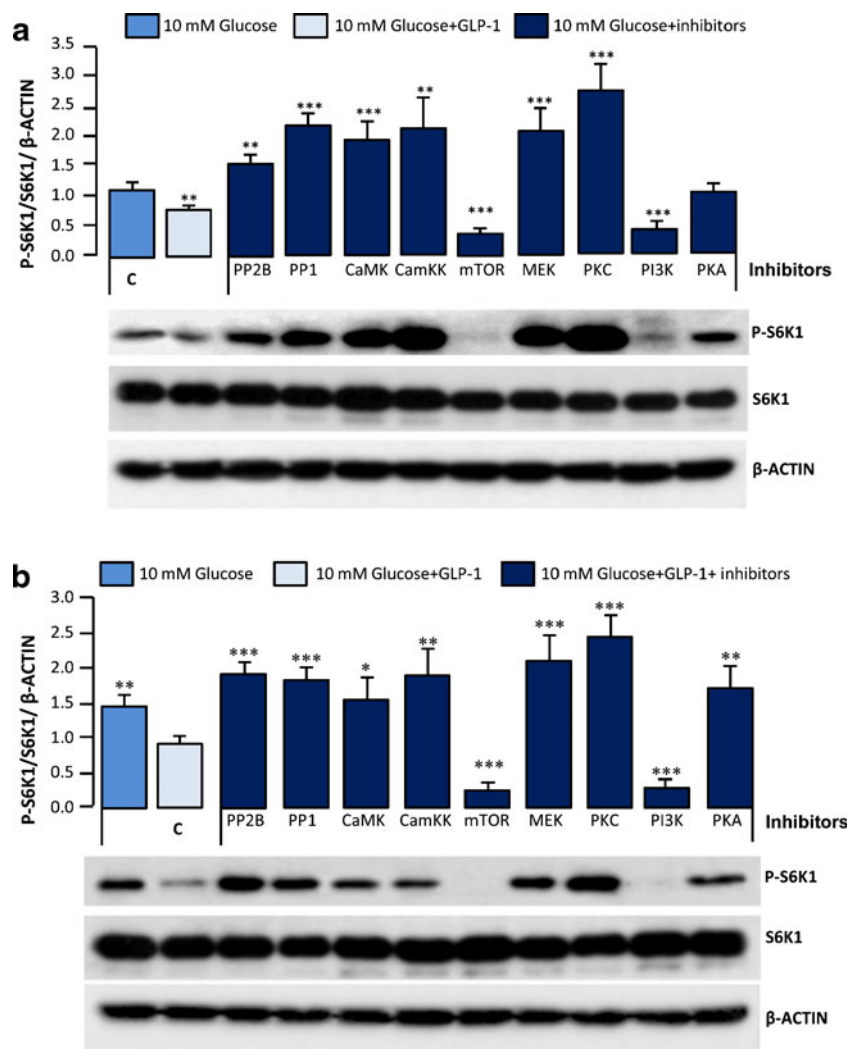
GLP-1 effects were abolished in PASK-silenced cells (Fig. 4b).

Cellular ATP content was measured at low and high glucose concentration. The ATP levels were increased at high glucose concentration in neuroblastoma cells. Regarding PASK-silenced cells, at low glucose we observed a level of ATP similar to that observed at high glucose levels in the control cells (Fig. 4c). We then checked the expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ co-activator 1α (PGC-1α), which can coordinate both mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation due to its role as a co-activator of PPAR family of nuclear receptors. PGC-1α expression was not altered in PASK knockdown cells, and no effect of glucose or GLP-1 was observed (Fig. 4d).

Impaired Effects of Glucose and GLP-1 on AMPK Activity and ACC Phosphorylation in PASK Knockdown Neuroblastoma N2A Cells

The activation of AMPK in N2A cells was checked using an anti-phospho-AMPKα (Thr172) after a doses-response treatment of glucose (0.5, 2.5, or 10 mM; Online Resource 3).

Fig. 7 Impact of several protein kinases and phosphatase inhibitors on the GLP-1-induced inhibition of S6K1 activity at high glucose concentration. N2A cells were incubated in the presence of 10 mM glucose for 4 h, treated or not with several inhibitors for 30 min (Table 1), in the absence (a) or presence (b) of 10 nM GLP-1 over the last 10 min. Cell lysates were exposed to microwave irradiation for 5 s and then processed for Western blot analysis of phospho-S6K1 (Thr389) (P-S6K1) and total S6K1 (S6K1) (a, b). Densitometric values were normalized by β -actin and by non-phosphorylated forms. **a** The value of 10 mM glucose without inhibitors was taken as 1 (C). The results are means \pm SEM; $n=3-4$. $**P<0.01$, 10 mM glucose compared with 0.5 mM glucose. **b** The value obtained in the cells treated with 10 mM glucose and 10 nM GLP-1 without inhibitors (C) was taken as 1. The results are means \pm SEM; $n=3-4$. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ vs. without inhibitors



Glucose levels that produced the maximum and minimum activation level (0.5 and 10 mM glucose) were used in subsequent studies. The data show that AMPK activities increased at low glucose concentration, while the presence of GLP-1 significantly decreased the AMPK activity previously stimulated by low glucose concentrations (Fig. 5a, d). The glucose effect on AMPK activity was not significant when Pask mRNA expression was inhibited by siRNA targeting Pask gene and the GLP-1 effect was lost, while no differences on AMPK α 2 protein expression were observed at low glucose in PASK knockdown cells compared to the control cells (Fig. 5b, d). However, the level of total AMPK α 2 decreased after 4–5 h treatment in the presence of high glucose levels in control neuroblastoma cells, and the glucose effect was lost in PASK-silenced neuroblastoma cells (Fig. 5b, d).

The activation of AMPK is associated with the enhanced phosphorylation of its downstream target acetyl-CoA carboxylase (ACC). The level of ACC phosphorylation followed a

similar pattern to AMPK at low glucose levels (Fig. 5c, d). An elevated phospho-ACC level was found at low glucose concentration. GLP-1 treatment decreased phospho-ACC level, and the amount of phospho-ACC significantly decreased at high glucose concentration. PASK silencing decreased the phospho-ACC level at low glucose concentration; the GLP-1 effect was impaired. However, the glucose effect on phospho-ACC level was still detected in PASK knockdown neuroblastoma cells (Fig. 5c, d).

LKB1 and CaMKK β Expression in PASK Knockdown Neuroblastoma N2A Cells

The expression of the AMPK upstream kinases, liver kinase B1 (LKB1), and the Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase (CaMKK β) was also analyzed. LKB1 expression was lower at high glucose both in PASK-silenced and control neuroblastoma cells (Fig. 6a, c). Furthermore, PASK-silenced cells showed a significant reduction in the expression of LKB1

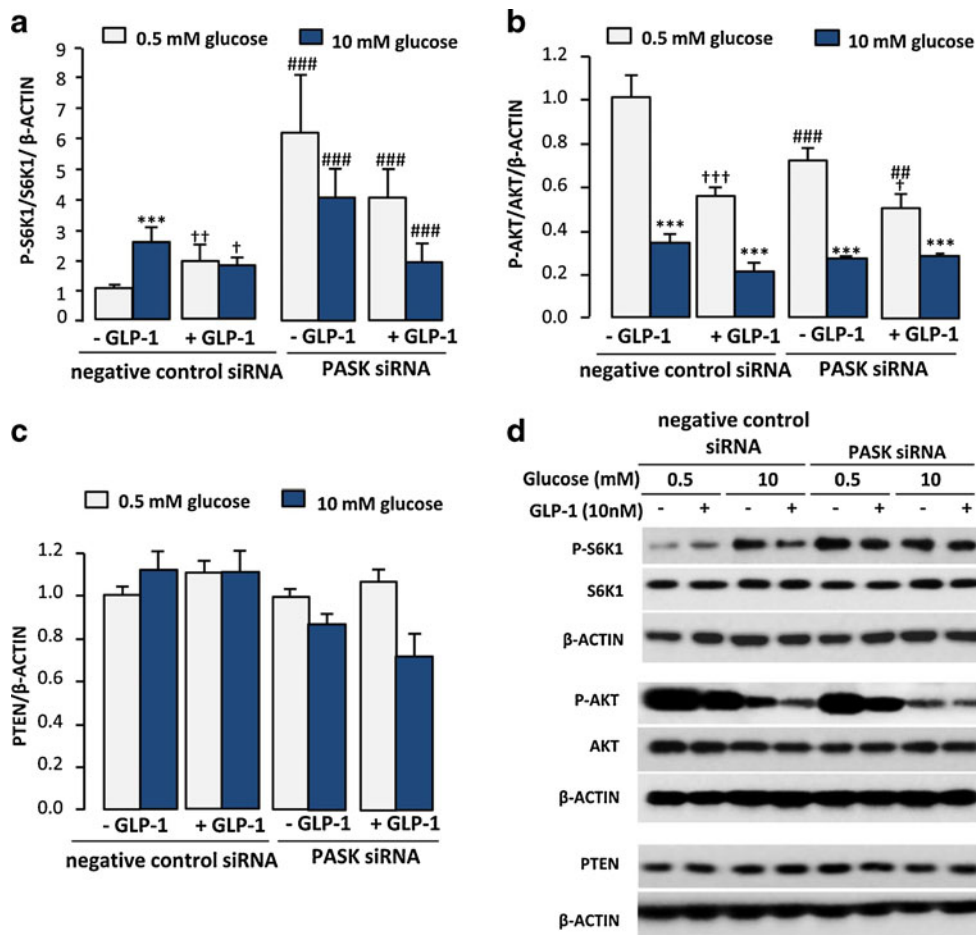


Fig. 8 Impaired effects of glucose and GLP-1 on the activity of S6K1 and AKT, and on the expression of PTEN, in Pask gene knockdown neuroblastoma cells. PASK knockdown N2A (PASK siRNA) and control cells (negative control siRNA) were serum-starved for 2 h and then incubated in a medium containing either 0.5 or 10 mM of glucose for 2 h with 10 nM during the last 10 min, in the case of activity determination (a, b, and d). On the other hand, total protein valuation was performed in cells incubated with different glucose concentrations and in the presence or absence of 10 nM GLP-1 for 5 h (c, d). Neuroblastoma cells were immediately lysed in a RIPA buffer and exposed to microwave irradiation for 5 s, after which they were processed for

Western blot analysis of phospho-S6K1 (Thr389) (P-S6K1) and total S6K1 (S6K1) (a, d); of phospho AKT (Ser 473) (P-AKT) and total AKT (AKT) (b, d) and of total PTEN (PTEN). The blots were reprobed for β-actin. Panel d shows the representative Western blots of graphs a, b, and d, respectively. Bar graphs represent the densitometric values, normalized by β-actin and by non-phosphorylated forms. The results are means±SEM; n=3–4. The value of negative control siRNA at 0.5 mM glucose without GLP-1 was taken as 1. ***P<0.001 10 mM glucose vs. 0.5 mM glucose; †P<0.05, ††P<0.01, †††P<0.001 absence of GLP-1 vs. the presence of 10 nM GLP-1; ##P<0.01 and ###P<0.001 PASK siRNA vs. negative control siRNA

compared to control cells. However, CaMKKβ protein expression was similar under all the conditions studied (Fig. 6b, c). PASK-silenced cells recorded a slight decrease in the amount of CaMKKβ protein (Fig. 6b, c).

Impaired Effects of Glucose and GLP-1 on S6K1 Pathway Activity in PASK Knockdown Neuroblastoma N2A Cells

The activation of S6K1 was detected using anti-phospho-S6K1 (Thr389) after treatment with different glucose concentrations (0.5, 2.5, or 10 mM) shown in Online Resource 3. Glucose levels that produced the maximum and minimum activation level were used in subsequent studies.

The effect of growth factors on the mTOR/S6K1 pathway is exerted through phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate kinase (PI3K) and further activation of AKT. The activation of Ras/MAPK cascade by mitogens can also activate mTOR. Signaling through this pathway is also regulated by the phosphatase PTEN, which controls the phosphorylation state of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), PI3K, and AKT.

We have checked the effect of certain specific inhibitors of protein kinases or phosphatases that might be involved in the regulation of S6K1 activation in the N2A cell line (Fig. 7). The stimulatory effect of high glucose on S6K1 phosphorylation was impaired in the presence of the specific inhibitors of

PI3K and mTOR (Fig. 7a). The inhibitory effect of GLP-1 on S6K1 activity was not detected in the presence of a specific PKA inhibitor (Fig. 7b).

The glucose and GLP-1 effect on the mTOR/S6K1 pathway was then analyzed. S6K1 activation was observed at high glucose, and the presence of GLP-1 also significantly decreased S6K1 activation (Fig. 8a, d). PASK knockdown cells showed a complete loss of the capability of the S6K1 to sense nutrient levels and respond to GLP-1 (Fig. 8a, d). The activation state of AKT was detected with anti-phospho AKT (Ser 473). The level of phospho-AKT increased at low glucose concentration, while the presence of GLP-1 decreased AKT activation at low glucose (Fig. 8b, d). PASK silencing decreased the stimulatory effect of low glucose, although AKT activation was still modulated by glucose and GLP-1 in PASK knockdown cells (Fig. 8b, d). The expression of phosphatase PTEN was similar in all the conditions analyzed (Fig. 8c, d).

Finally, we have checked the effect of AMPK activator AICAR in PASK knockdown cells. The presence of AICAR activated AMPK in both Pask-deficient and control cells. These effects on AMPK activation correlated with decreased level of phospho-S6K1 (data not shown).

Discussion

PASK plays different physiological functions in different tissues. Thus, PASK has been considered a nutrient sensor whose expression is upregulated by a high glucose concentration in Min-6 cells [14]. On the other hand, no evidence of PASK regulation by glucose has been observed in pancreatic beta-cells or testicular cell lines from PASKIN knockout and wild-type mice [15]. Further investigation has indicated that PASK-deficient mice have a metabolic phenotype [17] similar to that described in S6K1-deficient mice; in both cases, those mice were protected against obesity [28, 29].

We have recently reported that both AMPK and S6K1 activities respond to changes in glucose concentrations in neuroblastoma cells. Low glucose concentrations produced a rapid activation of AMPK. However, S6K1 was activated at high glucose concentrations in N2A cells, and the presence of anorexigenic peptide GLP-1 significantly decreased both AMPK and S6K1 activation. The observed response to glucose and GLP-1 is similar to that found in the rat hypothalamic areas involved in feeding behavior [22]. We contend here that PASK protein is also a nutrient sensor in neuroblastoma cells. Our data indicated that the Pask gene is upregulated

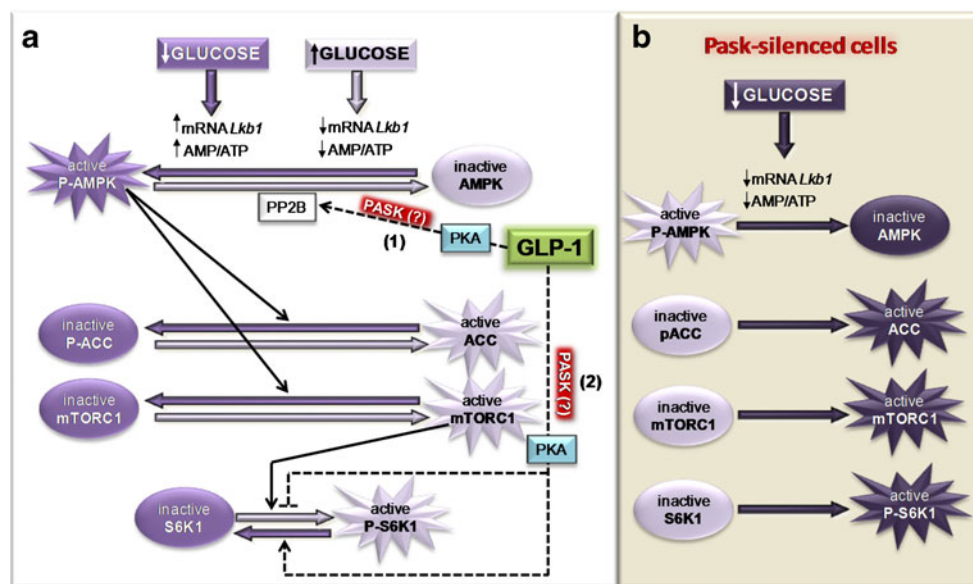


Fig. 9 Representative diagram of glucose and GLP-1 effect on the activity of AMPK and S6K1. The activation of AMPK depends on the glucose levels. **a** Fall in glucose (dark rows and shapes) leads to an increased transcription of Lkb1 and AMP/ATP ratio. The elevation of AMP/ATP ratio activates AMPK by phosphorylation. AMPK inactivation is mediated by the action of phosphatases such as PP2B. AMPK activation promotes inactivation of ACC and mTORC1, preventing the

activation of S6K1. GLP-1 stimulates PKA protein and exerts some effects in a PASK dependent way: (1) Stimulation of PP2B promoting the inactivation of AMPK and (2) inactivation of S6K1. **b** Fall in glucose in PASK-deficient cells leads to a decreased expression of Lkb1 and AMP/ATP ratio and, consequently, inactivation of AMPK and activation of ACC, mTORC1, and S6K1

by low glucose in neuroblastoma cells, and this effect was reversed in the presence of GLP-1.

The observed changes in mRNA coding to PASK were consistent with the changes in PASK protein. Thus, cells exposed to high glucose or to GLP-1 for more than 8 h significantly decreased the amount of PASK protein.

Hypothalamic metabolic sensors play an important role in feeding behavior, bodyweight homeostasis, and energy balance. Nutrients, orexigenic and anorexigenic peptides, and the signals that report on the status of energy stores may coordinate the activity of the metabolic sensors regulating food intake.

Here, the response of Pask to nutrients and gut peptides was observed not only in neuroblastoma cells but also in VMH and LH on rat hypothalamic slices. Both areas are involved in feeding behavior and energy homeostasis: VMH and LH are considered the satiety and hunger centers, respectively. Rat hypothalamic slices have previously been reported to preserve some tissue architecture and functional connections in order to maintain a selective c-Fos expression in response to different glucose concentrations [25] similar to that found in vivo [30]. We have also reported that glucose and GLP-1 regulate *Ampkα2* gene expression and both AMPK and S6K1 activity in these areas [22]. A similar approach has also been used to analyze neuropeptide expression [31]. In this regard, we show here that higher glucose concentration and GLP-1 treatment downregulate Pask mRNA expression in VMH and LH. However, the GLP1 effect at a high glucose concentration differed in both areas: GLP-1 treatment reversed the effect of high glucose specifically in LH, but not in VMH. A distinctive pattern of gene regulation in response to glucose and neuropeptides has also been previously reported in VMH and LH, including the expression of the GLP-1 receptor (GLP-1R) in these areas [22, 32]. The differences in the regulation of *Glp-1r* gene expression by glucose and neuropeptides in these areas might explain our results [32]. Our data show that the Pask gene is regulated by glucose and GLP-1, an anorexigenic peptide whose level increases after a meal, informing the central nervous system of nutrient status. This suggests that PASK may be involved in the control of food intake.

Another interesting finding was that the knockdown of more than 75 % Pask mRNA is sufficient to impair the response to glucose of the AMPK and mTOR/S6K1 pathways in neuroblastoma cells. However, previous data indicated that the activation of AMPK or mTOR signaling pathways was not dependent on the PASK function [17]. There are two possible explanations: first, the differences may be due to the experimental method used since we analyzed the response of the metabolic sensors at low and high glucose levels when activation/inhibition was maximal; second, this response may be cell or tissue specific. Nonetheless, the effect mediated by PASK in these pathways was mainly at posttranscriptional level. Thus, PASK knockdown in N2A cells did not

significantly modify the expression of gene coding to mTOR and S6K1. Nevertheless, a tendency to decrease the levels of gene coding to mTOR, AKT1, S6K1, eEF-2K, PDK1, GADPH, nNOS, and eIF-4B was observed in PASK-silenced cells. Therefore, the assumption that the total knock-out of PASK expression could change the expression of these genes cannot be ruled out. However, the expression of mRNA coding to LKB1 decreased in PASK-silenced cells. Unfortunately, we could not measure the expression of the mRNA coding to AMPKα2 in N2A cells using two different probes. This suggests the presence of point mutations, although we have not checked the sequence in these cells. However, AMPKα2 protein was detected by Western blot, and a similar amount of AMPKα2 was found at low glucose levels in PASK knockdown and control cells. Nevertheless, previous studies have reported that the level of AMPKα2 decreased after the prolonged presence of elevated glucose [22, 33, 34]. Here, we confirm this fact in control neuroblastoma cells and also show that the glucose effect was impaired after PASK silencing.

Previous data have reported the role of ATP levels in stimulating AMPK in neurons and the regulation of neuropeptides that modulate feeding behavior [31]. Therefore, the activation of AMPK at low energy states correlates with increases in the AMP/ATP ratio. Previous studies have affirmed that PASK increased oxidative metabolism and ATP generation in PASK knockdown L6 myoblast cell lines [17]. However, no differences were found in cellular ATP production in fibroblasts from PASKIN knockout mice [19]. Our data indicate that elevated levels of glucose and ATP in N2A cells corresponded to the lowest level of AMPK activation, while lower levels of ATP are associated with greater AMPK activation. By contrast, the presence of low glucose levels in PASK-deficient cells correlated with the enhanced concentration of ATP and the absence of AMPK activation.

AMPK activation is also regulated by several upstream kinases. In mammals, the two main kinases are LKB1 and CaMKKβ [5, 35]. Thus, the low expression of the mRNA coding to LKB1 at a low glucose level in PASK knockdown cells also explains the lack of AMPK activation. Similar data were found for LKB1-deficient muscle [36] or liver [37]. Our data show that the gene coding to LKB1 is regulated by glucose and GLP-1 in neuroblastoma cells. Low glucose increased the mRNA coding to LKB1. Nevertheless, that effect was lost in PASK-silenced cells. In contrast, previous results suggested a constitutive activation of LKB1 in cell lines and skeletal and cardiac muscle, as reviewed by [38]. Subsequent studies will be needed to clarify whether this finding is characteristic for this cell line.

We have previously reported that AMPK stimulation at low glucose levels was not inhibited by STO-699, a CaMKK inhibitor in N2A cells [22]. Here, we show a slight decrease in the CaMKKβ protein expression in PASK knockdown regarding the control cells. Taking into account the effects on

ATP concentrations, LKB1 and CaMKK β , our data would explain the lack of activation in PASK-deficient cells.

AMPK plays a key role in glucose and lipid metabolism. AMPK thus phosphorylates and inhibits ACC, whose activation prevented the entry into and oxidation of fatty acids in mitochondria. AMPK activation in the hypothalamus promoted by starvation induces ACC inactivation and a subsequent decrease in malonyl-CoA, and also stimulates fatty acid oxidation. Furthermore, it has been reported that ghrelin stimulates AMPK and other signaling pathways promoting the inhibition of lipogenesis and increasing fatty acid oxidation leading to changes in mitochondrial respiration, enhancing the production of reactive oxygen species and activating NPY/AgRP neurons [39, 40].

Our data confirm that at a high glucose concentration, and besides AMPK inhibition, the amount of phospho-ACC decreased sharply. The presence of GLP-1 did not change this result, according to previous data showing that the action of GLP-1 depends on the maximal activation of AMPK [22]. The level of AMPK activation in PASK-deficient cells at a low glucose concentration was similar to that found in control cells at high glucose according to the levels of ATP. In these PASK-deficient cells, an increase in glucose concentration did not significantly lower the level of phospho-AMPK, and phospho-ACC levels were almost undetectable. The differences in the levels of phospho-ACC and phospho-AMPK at high and low glucose concentration may be explained by differences in the localization of these proteins. Thus, the ACC is located exclusively in the cytoplasm, but its phosphorylation depends on the presence of AMPK. However, AMPK α 2 may move between the nucleus and the cytoplasm in agreement with previous reports indicating that low energy and increased oxidative stress concentrated AMPK in the nucleus [41]. It cannot be dismissed that the location of AMPK α 2 could be affected in PASK-deficient cells.

The lack of AMPK activation at low glucose concentrations was accompanied by an enhanced activation of S6K1. Our data indicated that the specific inhibitors of PI3K and mTOR in these cells impaired the effect of high glucose levels on S6K1 activation. We have therefore checked the activation level of AKT, as well as PTEN protein, at low and high glucose levels. Our data showed that N2A cells exposed to low glucose levels recorded the following: AMPK was activated, AKT was highly activated, and S6K1 was inhibited. GLP-1 treatment decreased both AMPK and AKT activity at a low glucose concentration. In contrast, PASK knockdown impaired AMPK activation at a low glucose concentration, and this effect could also explain the full activation of S6K1, while AKT was still activated in the absence of GLP-1 treatment, although the activation level was significantly lower than in the control cells. It has been reported that glucose starvation enhances AKT and GSK3 β activity mediated through AMPK activation in both cardiac and skeletal

myocytes and in primary skeletal myofibrils [42]. AMPK also phosphorylates the TSC2 inhibiting mTOR/S6K1 pathway. Under a glucose deficit, the feedback inhibition of this pathway mediated by S6K1 was not active, and the mTORC2 was highly activated by glucose starvation. This pathway will provide survival signals for these cells [42]. Additionally, S6K1 should exert a feedback inhibitory effect on this pathway by phosphorylating the insulin receptor substrate [43].

The contra-regulatory effect of AMPK on mTOR/S6K1 pathway was confirmed in Pask-silenced cells. As well as in control cells, AICAR treatment decreased S6K1 activity. AKT activation also regulates the phosphatase activity of PTEN, which controls the phosphorylation state of intermediaries of this pathway. AKT activation stimulates PTEN activity producing a negative feedback effect [44, 45]. The level of PTEN expression was not modified in PASK-silenced neuroblastoma cells. Our results showed that AKT activation was lower after PASK silencing. Nevertheless, the activation was still significantly higher than at high glucose levels, suggesting that survival pathways may still be functional, and other signaling proteins besides AMPK may regulate this process in neuroblastoma cells.

In conclusion, our data indicated that PASK is a nutrient and hormonal sensor in neuroblastoma cells and in VMH and LH from rat hypothalamic slices. Low glucose levels upregulated PASK in neuroblastoma cells. In these cells, at least, there is a coordinated response with the other metabolic sensors. Thus, the knockdown of PASK impaired not only the response of the AMPK and mTOR/S6K1 pathways at low and high glucose levels but also some of the GLP-1 effects observed at the level of both gene expression and AMPK and S6K1 activity (Fig. 9). PASK-deficient N2A cells failed to detect the availability of nutrients. The metabolic sensors in the brain have been directly related to feeding behavior, bodyweight, and energy homeostasis. Our data suggest that PASK might also play an important role in feeding behavior. PASK-deficient mice had a phenotype resistant to diet-induced obesity. It would be interesting to analyze the state of the AMPK and mTOR/S6K1 pathways in these mice.

Acknowledgments This work was supported by grants from MICINN (SAF2006-0475 and SAF2009-11297), Ayudas del Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación UCM-Banco Santander (GR58/08, GR35/10A, GR35/10B and GR42/10), Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña and IODURE project, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, an initiative of ISCIII (Ministerio de Ciencia e Innovación).

References

1. Grose JH, Smith TL, Sabic H, Rutter J (2007) Yeast PAS kinase coordinates glucose partitioning in response to metabolic and cell integrity signaling. *EMBO J* 26(23):4824–4830

2. Smith TL, Rutter J (2007) Regulation of glucose partitioning by PAS kinase and Ugp1 phosphorylation. *Mol Cell* 26(4):491–499
3. Hao HX, Rutter J (2008) The role of PAS kinase in regulating energy metabolism. *IUBMB Life* 60(4):204–209
4. Hardie DG, Carling D, Carlson M (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67:821–855
5. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(4):251–262
6. Rutter GA, Da Silva XG, Leclerc I (2003) Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J* 375(Pt 1):1–16
7. Alessi DR, Pearce LR, Garcia-Martinez JM (2009) New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal* 2(67):pe27
8. Foster KG, Fingar DC (2010) Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* 285(19):14071–14077
9. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1):21–35
10. Proud CG (2002) Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem* 269(22):5338–5349
11. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15(7):807–826
12. Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115(5):577–590
13. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30(2):214–226
14. da Silva XG, Rutter J, Rutter GA (2004) Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic duodenum homeobox 1 gene expression by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(22):8319–8324
15. Bortner E, Niessen M, Zuellig R, Spinass GA, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH (2007) Glucose-stimulated insulin production in mice deficient for the PAS kinase PASKIN. *Diabetes* 56(1):113–117
16. Katschinski DM, Marti HH, Wagner KF, Shibata J, Eckhardt K, Martin F, Depping R, Paasch U, Gassmann M, Ledermann B, Desbaillets I, Wenger RH (2003) Targeted disruption of the mouse PAS domain serine/threonine kinase PASKIN. *Mol Cell Biol* 23(19):6780–6789
17. Hao HX, Cardon CM, Swiatek W, Cooksey RC, Smith TL, Wilde J, Boudina S, Abel ED, McClain DA, Rutter J (2007) PAS kinase is required for normal cellular energy balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39):15466–15471
18. MacDonald PE, Rorsman P (2011) Per-arnt-sim (PAS) domain kinase (PASK) as a regulator of glucagon secretion. *Diabetologia* 54(4):719–721
19. Schlafli P, Bortner E, Spielmann P, Wenger RH (2009) The PAS-domain kinase PASKIN: a new sensor in energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 66(5):876–883
20. Blonde L, Klein EJ, Han J, Zhang B, Mac SM, Poon TH, Taylor KL, Trautmann ME, Kim DD, Kendall DM (2006) Interim analysis of the effects of exenatide treatment on A1C, weight and cardiovascular risk factors over 82 weeks in 314 overweight patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 8(4):436–447
21. Niswender K (2010) Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction—a complex interplay. *Diabetes Obes Metab* 12(4):267–287
22. Hurtado-Carneiro V, Sanz C, Roncero I, Vazquez P, Blazquez E, Alvarez E (2012) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) can reverse AMP-activated protein kinase (AMPK) and S6 kinase (P70S6K) activities induced by fluctuations in glucose levels in hypothalamic areas involved in feeding behaviour. *Mol Neurobiol* 45(2):348–361
23. Leon Y, Sanz C, Giraldez F, Varela-Nieto I (1998) Induction of cell growth by insulin and insulin-like growth factor-I is associated with Jun expression in the otic vesicle. *J Comp Neurol* 398(3):323–332
24. Sanz C, Vazquez P, Blazquez C, Barrio PA, Alvarez Mdel M, Blazquez E (2010) Signaling and biological effects of glucagon-like peptide 1 on the differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(3):E634–E643
25. Sanz C, Roncero I, Vazquez P, Navas MA, Blazquez E (2007) Effects of glucose and insulin on glucokinase activity in rat hypothalamus. *J Endocrinol* 193(2):259–267
26. Paxinos G, Watson C (2004) The brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, New York
27. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156–159
28. Pende M, Kozma SC, Jaquet M, Oorschot V, Burcelin R, Le Marchand-Brustel Y, Klumperman J, Thorens B, Thomas G (2000) Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 408(6815):994–997
29. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431(7005):200–205
30. Solomon A, De Fanti BA, Martinez JA (2006) Peripheral ghrelin participates in the glucostatic signaling mediated by the ventromedial and lateral hypothalamus neurons. *Peptides* 27(7):1607–1615
31. Lee K, Li B, Xi X, Suh Y, Martin RJ (2005) Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology* 146(1):3–10
32. Sanz C, Vazquez P, Navas MA, Alvarez E, Blazquez E (2008) Leptin but not neuropeptide Y up-regulated glucagon-like peptide 1 receptor expression in GT1-7 cells and rat hypothalamic slices. *Metabolism* 57(1):40–48
33. McCrimmon RJ, Fan X, Cheng H, McNay E, Chan O, Shaw M, Ding Y, Zhu W, Sherwin RS (2006) Activation of AMP-activated protein kinase within the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses in rats with defective counterregulation. *Diabetes* 55(6):1755–1760
34. Seo S, Ju S, Chung H, Lee D, Park S (2008) Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *Endocr J* 55(5):867–874
35. Viollet B, Athes Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L (2009) AMPK: lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci* 14:19–44
36. Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, Green KA, Grahame Hardie D, Ashworth A, Alessi DR (2005) Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J* 24(10):1810–1820
37. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC (2005) The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310(5754):1642–1646
38. Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D (2007) Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403(1):139–148
39. Lopez M, Vidal-Puig A (2008) Brain lipogenesis and regulation of energy metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11(4):483–490
40. Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschop MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S (2008) UCP2 mediates

- ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454(7206):846–851
41. Kodiha M, Rassi JG, Brown CM, Stochaj U (2007) Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK1/2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 293(5):C1427–C1436
42. Chopra I, Li HF, Wang H, Webster KA (2012) Phosphorylation of the insulin receptor by AMP-activated protein kinase (AMPK) promotes ligand-independent activation of the insulin signalling pathway in rodent muscle. *Diabetologia* 55(3):783–794
43. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A (2005) Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146(3):1473–1481
44. Al-Khouri AM, Ma Y, Togo SH, Williams S, Mustelin T (2005) Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3 β . *J Biol Chem* 280(42):35195–35202
45. Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, Carnero A (2007) PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 28(7):1379–1386

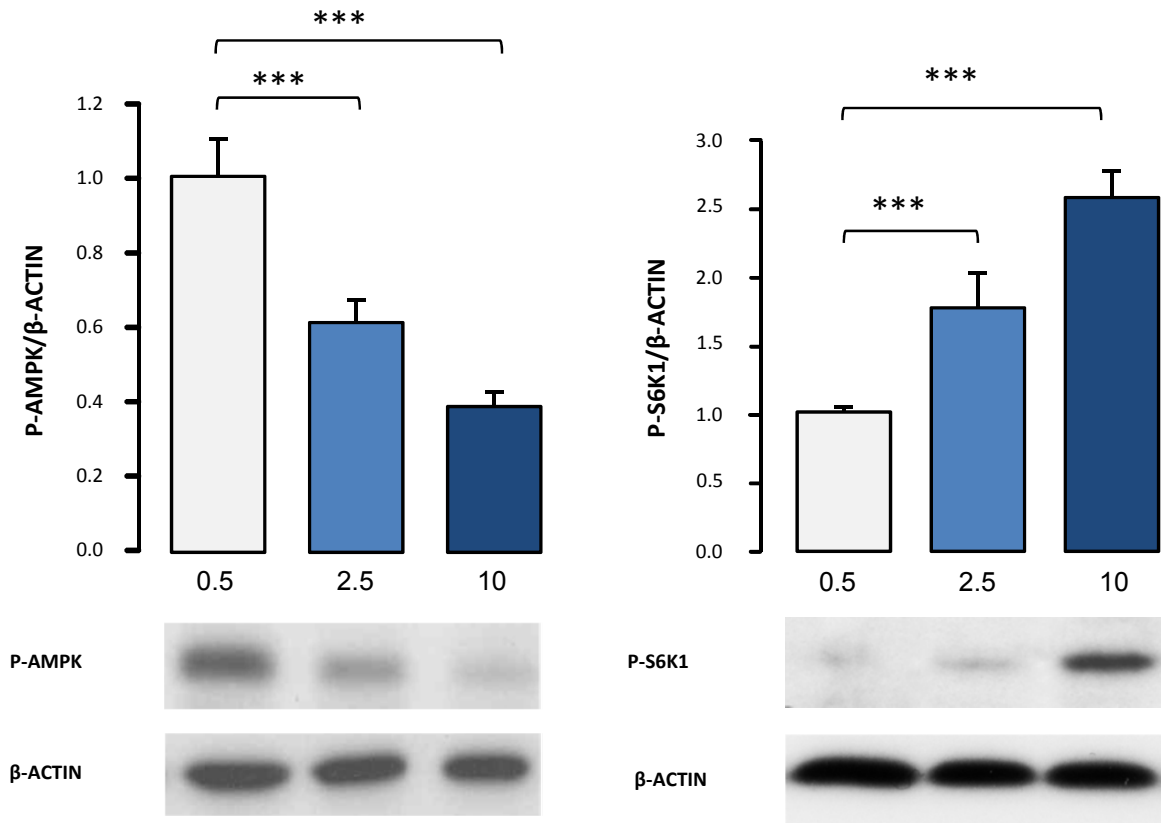
Online Resource 1. Primers and probes for real-time RT-PCR analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer	Taqman probe
<i>I8s</i>			Hs 99999901_s1
<i>Rat Prkaa2</i> (AMPK α 2)	5'-GTGGATCGCCAAATTATGCA-3'	5'-GGGAGGGGTGCCACAGAGAA-3'	6-FAM-TAC AGC CTT CTT GAC ATG A-MGB
<i>Mouse Prkaa2</i> (AMPK α 2)			Mm 01264789_m1
<i>Rat Pask</i> (PASK)	5'-TGGACTGCAGTGGAGAAAGGGA-3'	5'-ATCCTCTAAAAACCTTCTCCTTCTTAATAAAA-3'	6-FAM-ACA AAG AGA TGG TGG TGA A-MGB
<i>Mouse Glp-1r</i> (GLP-1R)			Mm 00445292_m1
<i>Mouse-Rat SF-1</i>	5' -AGCTGCTGGTGTGGACCA-3'	5'-TCCAGTAACACAGCAGGATGCT-3'	
<i>Mouse Prepro-orexin</i>	5' -CTCAGACTCCTTGGGTATTT-3'	5'-CAATCCGGAGAGAGATGGT -3'	

Online Resource 2. Primers for real-time RT-PCR analysis

Gene Symbol	Gen Identification	Mouse probe identification (Taq Man®Assay)	Protein name
<i>Rn 18s</i>	19791	Hs99999901_s1	18S
<i>Actb</i>	11461	Hs99999903_m1	β-ACTIN
<i>Pask</i>	269224	Mm00435916_m1	PASK
<i>Prkar2a</i>	19087	Mm00435916_m1	PKA RIIα
<i>Rps6kb1</i>	72508	Mm01310033_m1	S6K1
<i>Mtor</i>	56717	Mm00444968_m1	mTOR
<i>Eif4b</i>	75705	Mm00778003_s1	eIF-4B
<i>Rps6</i>	20104	Mm02342456_g1	S6
<i>Eef2k</i>	13631	Mm00432996_m1	eEF-2K/CaMK
<i>Eef1a1</i>	13627	Mm01973893_m1	eEF1-α1
<i>Stk11</i>	20869	Mm00488470_m1	LKB1
<i>Pdk1</i>	228026	Mm00499855_m1	PDK1
<i>Tsc2</i>	22084	Mm00442004_m1	TSC2
<i>Akt1</i>	11651	Mm01331624_m1	AKT1
<i>nNos1</i>	18125	Mm00435175_m1	nNOS
<i>Hipk2</i>	15258	Mm00439329_m1	HIPK2
<i>Gapdh</i>	14433	Mm99999915_g1	GAPDH

Electronic supplementary material



Online Resource 3. Effect of glucose concentration on AMPK and S6K-1 activity. N2A cells were cultured in DMEM/F-12 containing 10% FBS, 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml) and 0.5 mM glucose for 2 h. Then, the medium was removed and the cells were incubated for 2 h and 4 h in a medium containing 0.5, 2.5 or 10 mM glucose for the study of AMPK and S6K-1 activity respectively. N2A cells were immediately lysed in RIPA buffer and exposed to microwave irradiation for 5 s, then Laemmli buffer was added and processed for western blot analysis of phospho-AMPK (P-AMPK) and phospho-S6K1 (P-S6K1). The blots were reprobed for β -Actin. Densitometric values were normalized by β -ACTIN. The value obtained in the cells treated with 0.5 mM glucose was taken as 1. The results are means \pm SEM; $n = 3-5$. *** $P < 0.001$ (0.5 mM glucose vs 2.5 and 10 mM glucose)

3 ARTÍCULO 3. LA QUINASA CON DOMINIOS PAS ES UN SENSOR DE NUTRIENTES Y DE ENERGÍA EN ÁREAS HIPOTALÁMICAS NECESARIO PARA MANTENER LA FUNCIÓN NORMAL DE AMPK Y mTOR/S6K1

[*Mol Neurobiol* Aceptado 24/12/2013]

RESUMEN

Las complicaciones causadas por el sobrepeso, la obesidad y la diabetes tipo 2 son uno de los principales problemas que incrementan la morbilidad y la mortalidad en los países desarrollados. Los sensores metabólicos hipotalámicos juegan un papel importante en el control de la alimentación y en la homeostasis energética. La quinasa con dominios PAS (PASK) es un sensor de nutrientes considerado como un regulador del metabolismo de la glucosa y de la energía celular. El papel de PASK podría ser similar al de otros sensores metabólicos conocidos, tales como la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) y la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR). Los ratones deficientes en PASK son resistentes a la obesidad inducida por la dieta. Hemos publicado anteriormente que las vías AMPK y mTOR/S6K1 están reguladas en el hipotálamo ventromedial (VMH) y lateral (LH) en respuesta a estados nutricionales, y que el péptido anorexigénico GLP-1/exendina-4 modula estas vías en ratas Zucker obesas y controles delgadas. En este trabajo de investigación identificamos a la PASK en áreas hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta. Además, comprobamos que la expresión de esta quinasa se encontraba regulada por las condiciones nutricionales (ayuno/re-alimentación) y estaba modulada por la exendina-4. Los ratones deficientes en PASK presentaban una respuesta alterada en la activación de AMPK y mTOR/S6K1. Así, en estos ratones la AMPK y S6K1 hipotalámicas estaban activas bajo condiciones de ayuno/re-alimentación. Asimismo, en este estudio, observamos que el efecto regulador de la exendina-4 en la actividad metabólica de estos sensores se perdió en ratones deficientes en PASK, y que las propiedades anorexigénicas de la exendina-4 se redujeron significativamente, lo que sugería que PASK podría actuar como un mediador en la vía de señalización del GLP-1. Nuestros datos indican que la función de PASK podría ser crítica para preservar el efecto de los nutrientes en las vías de AMPK y mTOR/S6K1 y mantener el papel regulatorio de la exendina-4 en la ingesta de

alimentos. Algunos de los efectos antidiabetogénicos de la exendina-4 podrían ser modulados a través de estos procesos.

PAS Kinase Is a Nutrient and Energy Sensor in Hypothalamic Areas Required for the Normal Function of AMPK and mTOR/S6K1

Verónica Hurtado-Carneiro · Isabel Roncero ·
Sascha S. Egger · Roland H. Wenger ·
Enrique Blazquez · Carmen Sanz · Elvira Alvarez

Received: 10 October 2013 / Accepted: 24 December 2013
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract The complications caused by overweight, obesity and type 2 diabetes are one of the main problems that increase morbidity and mortality in developed countries. Hypothalamic metabolic sensors play an important role in the control of feeding and energy homeostasis. PAS kinase (PASK) is a nutrient sensor proposed as a regulator of glucose metabolism and cellular energy. The role of PASK might be similar to other known metabolic sensors, such as AMP-activated protein kinase (AMPK) and the mammalian target of rapamycin (mTOR). PASK-deficient mice resist diet-induced obesity. We have recently reported that AMPK and mTOR/S6K1 pathways are regulated in the ventromedial and lateral hypothalamus in response to nutritional states, being modulated by anorexigenic glucagon-like peptide-1 (GLP-1)/exendin-4 in

lean and obese rats. We identified PASK in hypothalamic areas, and its expression was regulated under fasting/re-feeding conditions and modulated by exendin-4. Furthermore, PASK-deficient mice have an impaired activation response of AMPK and mTOR/S6K1 pathways. Thus, hypothalamic AMPK and S6K1 were highly activated under fasted/re-fed conditions. Additionally, in this study, we have observed that the exendin-4 regulatory effect in the activity of metabolic sensors was lost in PASK-deficient mice, and the anorexigenic properties of exendin-4 were significantly reduced, suggesting that PASK could be a mediator in the GLP-1 signalling pathway. Our data indicated that the PASK function could be critical for preserving the nutrient effect on AMPK and mTOR/S6K1 pathways and maintain the regulatory role of

Carmen Sanz and Elvira Alvarez contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12035-013-8630-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. Hurtado-Carneiro · I. Roncero · E. Blazquez · C. Sanz · E. Alvarez
Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of
Medicine, Complutense University, Plaza S. Ramón y Cajal, s/n,
Madrid 28040, Spain

V. Hurtado-Carneiro
e-mail: verohur@med.ucm.es

I. Roncero
e-mail: ironcero@med.ucm.es

S. S. Egger · R. H. Wenger
Institute of Physiology and Zurich Center for Integrative Human
Physiology ZIHP, Zurich, Switzerland

S. S. Egger
e-mail: sascha.egger@access.uzh.ch

R. H. Wenger
e-mail: roland.wenger@access.uzh.ch

V. Hurtado-Carneiro · I. Roncero · E. Blazquez · C. Sanz · E. Alvarez
Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated
Metabolic Disorders (CIBERDEM), Madrid, Spain

V. Hurtado-Carneiro · I. Roncero · E. Blazquez · C. Sanz · E. Alvarez
Institute of Medical Research at the Hospital Clínico San Carlos
(IdISSC), Madrid, Spain

E. Blazquez
e-mail: eblazquez@med.ucm.es

C. Sanz (✉)
Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense
University, Plaza S. Ramón y Cajal, s/n, Madrid 28040, Spain
e-mail: mcsanz@ucm.es

exendin-4 in food intake. Some of the antidiabetogenic effects of exendin-4 might be modulated through these processes.

Keywords AMPK · Antidiabetogenic agents · Food intake · Metabolic sensors · mTOR/S6K · PASK · Obesity

Introduction

The PAS kinase (PASK), also termed PASKIN, is a nutrient sensor conserved from yeast to human beings. In mammals, PASK is involved in the regulation of glucose and energy metabolism homeostasis [1–3]. Thus, it has been proposed that PASK is activated by small metabolites and may regulate glycogen synthesis and protein translation. PASK could regulate glucose metabolism and cellular energy homeostasis [4, 5]. Initially, PASK-deficient mice showed no developmental, growth, or reproductive defects [6]. Later investigation indicated that PASK-deficient mice are resistant to diet-induced obesity, and PASK knockdown by RNAi in cultured myoblasts causes increased glucose and palmitate oxidation and elevated cellular ATP levels [7]. Additionally, PASK is also implicated in the regulation of glucagon secretion by glucose, and PASK expression was lower in pancreatic islets from human with type 2 diabetes [8]. The role of PASK might therefore be similar to better known metabolic sensors, such as AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR). AMPK senses cellular energy availability by detecting the AMP/ATP ratio. AMPK is activated in low energy states and promotes ATP-generating catabolic pathways and inhibits anabolic reactions [9–11]. By contrast, mTOR and its downstream target, the S6 kinase 1 (S6K1), respond to nutrients and hormonal signals [12–14] and increase their activities in the presence of nutrient abundance [15]. Thus, mTOR complex 1 (mTORC1) is rapamycin- and nutrient-sensitive, regulating metabolism and cell growth in response to several environmental signals. Accordingly, amino acids, growth factors and mitogens activate mTORC1 and lead to an increase in protein synthesis and stimulation of cell growth [16]. By contrast, mTORC1 activity is inhibited under conditions of energy depletion coordinated with AMPK activity. An increase in the AMP/ATP ratio activates AMPK, which phosphorylates the tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), and this modification induces the concomitant inhibition of mTORC1 mediated by TSC1-TSC2 complex [17]. Furthermore, AMPK phosphorylates raptor (rapamycin-sensitive adaptor protein of mTOR) in mTORC1, inducing the downregulation of this complex [18]. Additionally, energy depletion inhibits mTORC1 through an independent mechanism of AMPK activation [19]. AMPK is additionally inhibited by the phosphorylation of mTOR/S6K1 [20]. The hypothalamic AMPK [21] and mTOR/S6K

pathways [22] have been implicated in the control of feeding and the regulation of energy balances.

We have recently reported that PASK expression is regulated by glucose and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in rat ventromedial (VMH) and lateral hypothalamus (LH) areas from hypothalamic organotypic cultures and that there is an impaired response of AMPK and mTOR/S6K1 pathways in PASK-silenced neuroblastoma cells [23]. GLP-1 is an incretin, resulting from the posttranslational processing of preproglucagon that is secreted by L-intestinal cells after eating. Its structural analogue, exendin-4, is used as an antidiabetogenic agent due to its longer half-life and ability to promote the secretion of insulin when glucose increases. In addition, exendin-4 has anorexigenic properties administered both peripheral and at the central nervous system level [24]. In this sense, we have recently reported that the regulation of AMPK and mTOR/S6K1 pathways in response to changes in nutrient concentration could be modulated by the presence of GLP-1/exendin-4, which counteracts the activation/inactivation of AMPK and mTOR/S6K1 in the hypothalamic areas involved in feeding behaviour (VMH and LH) [25]. Thus, it seems that exendin-4 might balance the proper activation of these metabolic sensors in lean and obese rats, helping to improve pathophysiological states such as obesity [25].

Here, we have investigated the expression of PASK in mouse brain, as well as the effects of nutrients and exendin-4 on its expression in hypothalamic areas involved in feeding behaviour. Furthermore, we have investigated the possible relationships between PASK and other metabolic sensors by analysing the expression and activity of AMPK and mTOR/S6K1 pathways in VMH and LH areas under fasting and re-feeding conditions, as well as the effect of the anorexigenic peptide exendin-4 in PASK-deficient mice.

Materials and Methods

Animals

All procedures involving animals were approved by the appropriate Institutional Review Committee and met the guidelines for the care of animals specified by the European Community. The animals used were 10- to 16-week-old males (25–30 g), C57Bl/6 wild-type and PASK-deficient mice backcrossed into C57Bl/6 for at least 12 generations [6]. The animals were fed ad libitum with a standard pellet diet and housed at a constant temperature (21 °C) on a 12-h light-dark cycle, with lights on at 8 a.m.

Measuring Blood Plasma Glucose and Insulin Levels

Glucose levels were sampled from mouse tail bleeds using a Glucometer Elite meter (Bayer Corp., Elkhart, IN, USA).

Blood plasma insulin levels were determined using a competitive ELISA Kit (Millipore, MA, USA), following the manufacturer's instructions.

X-Gal Staining

Hypothalamic slices of 500 μm were used for 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) staining. Hypothalamic slices were fixed in 0.2 % glutaraldehyde, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 and 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.3) for 16 h. Then, they were permeabilized in 0.01 % Na-deoxycholate, 0.02 % NP-40, 2 mM MgCl_2 and 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.3) and incubated in X-Gal solution [5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 2 mM MgCl_2 , 0.02 % NP-40, 0.01 % Na-deoxycholate, 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.3), 0.1 % X-Gal] for at least 5 h at 30 °C until colour developed.

Isolation of Hypothalamic Areas

Mice *Pask*^{-/-} and C57Bl/6 wild-type mice were fasted for 48 h. Some animals were re-fed for 3 h, and some of them were treated subcutaneously with exendin-4 (250 ng/100 g body weight, Bachem) for 1 to 4 h. The hypothalami were removed from the brains and sectioned at 500 μm . VMH and LH were isolated by micropunching according to the stereotaxic coordinates [26, 27].

Polymerase Chain Reaction

The total RNA from VMH and LH from C57Bl/6 wild-type and PASK-deficient mice was isolated by the acid-guanidinium isothiocyanate method [28]. RNA integrity was tested with the Bioanalyzer 2100 (Agilent), and cDNA synthesis was developed using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), using 1 μg of RNA as a template, following the manufacturer's instructions. In order to ensure the purity of VMH and LH, a PCR was developed using the primers to amplify *steroidogenic factor 1* (*Sf-1*) and *prepro-rexin* (Online resource 1) as described [23]. Briefly, the PCR conditions were as follows: 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, and a final extension cycle at 72 °C for 10 min. The amplified fragments were analysed by agarose gel electrophoresis.

Real-time polymerase chain reaction (TaqMan® Assay). The mRNA levels of *Pask*, *Ampk α 2*, *Glp-1r*, β -actin and *18s rRNA* were measured by real-time quantitative RT-PCR using TaqMan® probes (Applied Biosystems) (Online resource 1) as described [23]. Briefly, PCR was developed in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The conditions were 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min.

Multiple gene expression analyses in TaqMan® Gene Expression Assay. Quantity real-time PCR was developed using

the TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix and Roche Diagnostics on TaqMan® Array 96-Well Fast Plates containing 17 customized duplicated genes (Online resource 1) as described [23]. Briefly, 2 μl of the synthesized cDNA was diluted in a final volume of 100 μl and applied to each port of the TLDA card. PCR was developed in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The conditions were 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. *18s* and β -actin housekeeping genes were used for normalization. Median normalization was performed as follows: the median cycle threshold (CT) value of all the genes on each TLDA card was subtracted from the CT value for each reaction well on that card, whereby after normalization, the median CT value on each card was zero. The average *18s* or β -actin CT values on each TLDA card were then subtracted from the CT value for each reaction well on that card.

Protein Expression and Activity of AMPK and mTOR/S6K1 Pathways

For the analysis of protein expression and activity by western blotting, a tiny piece of frozen liver (~150 mg) or the hypothalamic nuclei were immediately lysed in RIPA buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 % sodium deoxycholate, 1 % Triton X-100, 0.25 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 2.5 mM sodium pyrophosphate] and a tablet of protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Tissues were then exposed immediately to microwave irradiation for 5 s and then homogenized [25]. Total and phosphorylated forms were detected by western blotting using the antibodies described (Table 1). The blots were reprobated for β -actin. Finally, the blots were scanned and quantified using Quantity One software (Bio-Rad, GS-800 Densitometer).

Food Intake

The feeding response to exendin-4 treatment was tested as previously described [29]. Briefly, male C57Bl/6 wild-type and PASK-deficient mice were fasted overnight. Exendin-4 (250 ng/100 g body weight, Bachem) in saline or the saline vehicle alone was subcutaneously injected, and 1 h after the exendin injection, the mice were re-fed and the food intake was measured 30, 60 and 120 min later.

Statistical Analyses

All values are presented as means \pm SEM. The groups were compared using a *t* test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Table 1 Antibodies and conditions used for western blot assays

Antibody	Host	Manufacturer	Dilution used
Anti-ACC	Rabbit	Millipore Iberica, Madrid, Spain	1:1,000
Anti-phospho-ACC(Ser 79)	Rabbit	Millipore Iberica, Madrid, Spain	1:500
Anti-AMPK α	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1,000
Anti-phospho-AMPK α (Thr172)	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1,000
Anti- β -actin	Mouse	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	1:5,000
Anti-S6K1	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1,000
Anti-phospho-S6K1(Thr389)	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1,000
Anti-rabbit-HRP	Goat	Millipore Iberica, Madrid, Spain	1:5,000
Anti-mouse-HRP	Goat	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA	1:5,000

Results

PASK Expression in Mouse Hypothalamus

X-Gal staining of hypothalamic region of *Pask*^{-/-} mice revealed PASK-positive cells located in several hypothalamic areas, mainly in arcuate and paraventricular nuclei, as well as in VMH and less intensively in LH. A strong labelling was also observed in the walls lining the third ventricle (Fig. 1a). *Pask* mRNA was detected using two sets of primers (Fig. 1b). No detection of the *Pask* mRNA in PASK-deficient mice was observed using primers that recognize the kinase domain, as is to be expected in *Pask*^{-/-} mice. However, primers recognizing exons 7 and 8, which are maintained in PASK-deficient mice, recorded a higher level of mRNA in both VMH and LH in *Pask*^{-/-} mice compared to wild-type specimens (Fig. 1b, c).

Effect of PASK Deficiency on the Expression of Metabolic Genes in Mouse VMH and LH

To evaluate the role that PASK plays in the control of feeding, we analysed the expression of other metabolic sensors in hypothalamic areas involved in food intake and energy homeostasis. The mRNA levels were measured with real-time RT-PCR in VMH and LH from fasted C57Bl/6 wild-type and PASK-knockout mice in the presence or absence of exendin-4. We measured the expression of genes coding for metabolic sensors including AMPK α 2 and mTOR/S6K1; several genes as direct or indirect regulators of metabolic sensor activity, such as AKT, LKB1, PKARII α and TSC2; several direct substrates of PASK, AMPK and mTOR/S6K1 pathways: S6, eIF4B, eEF-2K, eEF1- α 1 and nNOS; genes whose products regulate carbohydrate metabolism: GAPDH and PDK1; and additionally, GLP-1 receptor (GLP-1R), homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2), a mediator of apoptotic pathways in neurons and a housekeeping gene: β -actin. In the absence of any treatment, the expression of mRNA coding for mTOR, AMPK α 2 and S6K1 was similar in VMH and LH from wild-type and PASK-deficient mice, but PASK-deficient

mice had lower *Ampk* α 2 mRNA levels in VMH, and a similar tendency was observed in LH, although no significant differences were found (Fig. 2a). The expression of genes coding for AKT, LKB1, PKARII α and TSC2 was similar in PASK-deficient and wild-type mice (Fig. 2b); our data also showed no changes in the expression of mRNAs coding for S6, eEF1- α 1, eEF-2K, eIF4B and nNOS1 (Online resource 2A), and similar expressions of GAPDH and PDK1 (Online resource 2B) were found in both types of mice. The expression of genes coding for PKARII α , eIF4B, eEF1- α 1 and nNOS1 was lower in LH than VMH in wild-type mice. By contrast, *Hipk2* mRNA levels were higher in LH from PASK-deficient mice (Fig. 2c). Therefore, our data suggests that the expression of *Ampk* α 2 and *Hipk2* (a mediator of apoptotic pathways in neurons) might be mediated by PASK protein either directly or indirectly. After exendin-4 treatment, we observed a decreased expression of GLP-1R in VMH and LH from wild-type mice (Fig. 2c). By contrast, the presence of exendin-4 increased the expression of LKB1, eEF1- α 1, and S6 in VMH from wild-type mice (Fig. 2b and Online resource 2A). However, the absence of an exendin-4 effect in PASK-deficient mice explains the lower levels of LKB1, TSC2, AKT1, mTOR, eEF1- α 1 and nNOS1 in VMH from PASK-deficient mice compared to their wild-type counterparts.

PASK Expression Responds to Fasting and Re-feeding in VMH and LH from Wild-Type Mice

PASK has already been proposed as a nutrient sensor [7], so we analysed PASK mRNA expression under fasting and re-feeding conditions in VMH and LH from wild-type and PASK-deficient mice. In order to ensure the purity of these hypothalamic nuclei obtained by micropunching from mouse hypothalamus, *Sf-1* and *prepro-orexin* genes were used as markers of these specific nuclei, respectively. The mRNA encoding SF-1 was mostly present in VMH, whereas *prepro-orexin* mRNA levels were higher in LH (Fig. 3a). Re-feeding increased *Pask* mRNA expression in LH in wild-type mice. The *Pask* mRNA level was lower in LH than that in

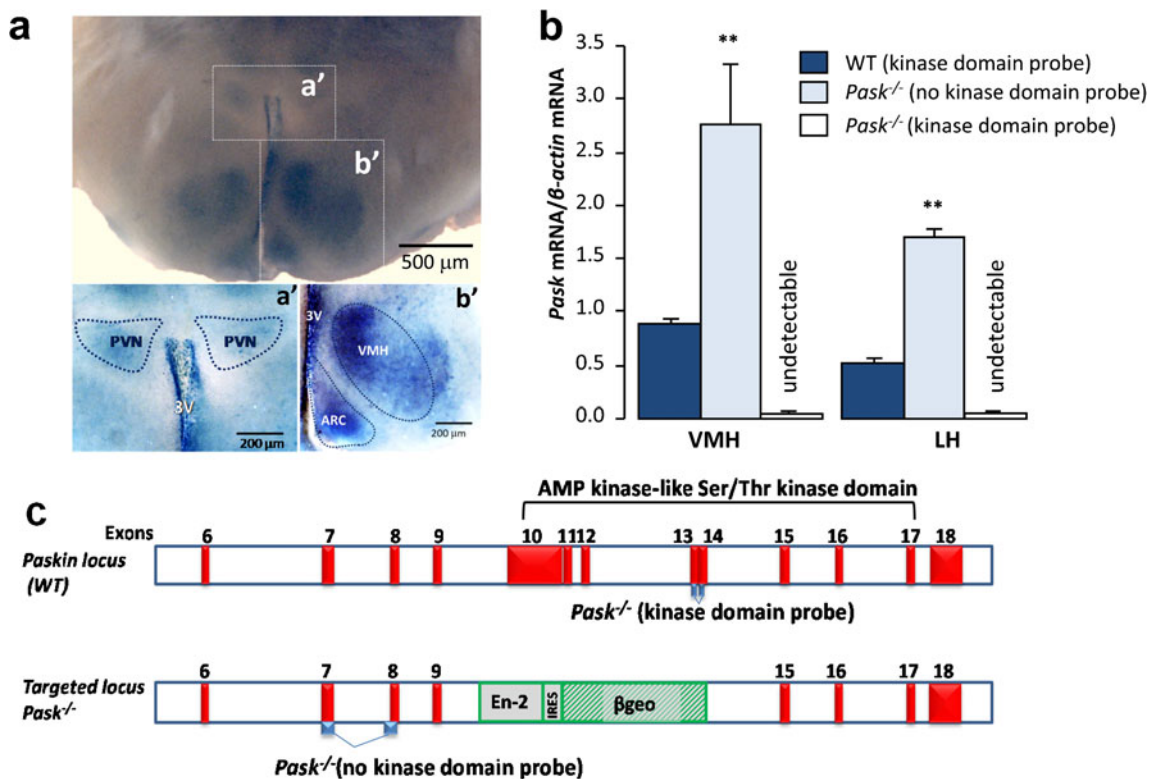


Fig. 1 PASK is expressed in VMH and LH of mice. **a** *Pask* expression pattern, revealed by X-gal staining of a 500-μm hypothalamic slice from *Pask*^{-/-} mice. (*a*) and (*b*) show a higher magnification of boxed areas. *PVN* paraventricular nucleus, *VMH* ventromedial nucleus, *ARC* arcuate nucleus, *3V* third ventricle. **b** *Pask* mRNA levels in VMH and LH from wild-type (WT) and PASK-deficient mice (*Pask*^{-/-}). The mRNA coding for PASK was detected by quantitative real-time PCR, using two different probes located 5' to the targeted region or located in the targeted kinase

domain, as indicated. The bars represent the means \pm SEM of the ratios respect to β -actin of the values obtained from quantitative real-time PCR of three independent experiments carried out in duplicate. The values obtained in the VMH of the wild-type animals were considered as 1. $^{**}P < 0.01$, WT vs. *Pask*^{-/-}. **c** Schematic representation of the deleted kinase domain in *Pask*^{-/-} mice and the location of probes used in the quantitative real-time PCR

domain, as indicated. The bars represent the means \pm SEM of the ratios respect to β -actin of the values obtained from quantitative real-time PCR of three independent experiments carried out in duplicate. The values obtained in the VMH of the wild-type animals were considered as 1. $^{**}P < 0.01$, WT vs. *Pask*^{-/-}. **c** Schematic representation of the deleted kinase domain in *Pask*^{-/-} mice and the location of probes used in the quantitative real-time PCR

lost in PASK-deficient mice (Fig. 4a). AMPK activation is associated with the enhanced phosphorylation of its downstream target acetyl-CoA carboxylase (ACC). The level of ACC phosphorylation in LH was also reduced after re-feeding in wild-type mice (Fig. 4b). The phospho-ACC levels were elevated in both fasted and re-fed states in hypothalamic areas in PASK-deficient mice (Fig. 4b).

Altered S6K1 Activation in VMH and LH from PASK-Deficient Mice Under Fasting or Re-feeding Conditions

The activation/inhibition of the mTOR/S6K1 pathway was determined. In fasted conditions or after 3 h of re-feeding, the amount of S6K1 was similar in VMH and LH in both PASK-deficient and wild-type mice. The activation of S6K1 was detected using anti-phospho-S6K1 (Thr389). Re-feeding increased S6K1 activity significantly in LH, and similar results were observed in VMH, although no significant differences were recorded (Fig. 5). However, S6K1 activity was enhanced in both

lost in PASK-deficient mice (Fig. 4a). AMPK activation is associated with the enhanced phosphorylation of its downstream target acetyl-CoA carboxylase (ACC). The level of ACC phosphorylation in LH was also reduced after re-feeding in wild-type mice (Fig. 4b). The phospho-ACC levels were elevated in both fasted and re-fed states in hypothalamic areas in PASK-deficient mice (Fig. 4b).

Altered S6K1 Activation in VMH and LH from PASK-Deficient Mice Under Fasting or Re-feeding Conditions

The activation/inhibition of the mTOR/S6K1 pathway was determined. In fasted conditions or after 3 h of re-feeding, the amount of S6K1 was similar in VMH and LH in both PASK-deficient and wild-type mice. The activation of S6K1 was detected using anti-phospho-S6K1 (Thr389). Re-feeding increased S6K1 activity significantly in LH, and similar results were observed in VMH, although no significant differences were recorded (Fig. 5). However, S6K1 activity was enhanced in both

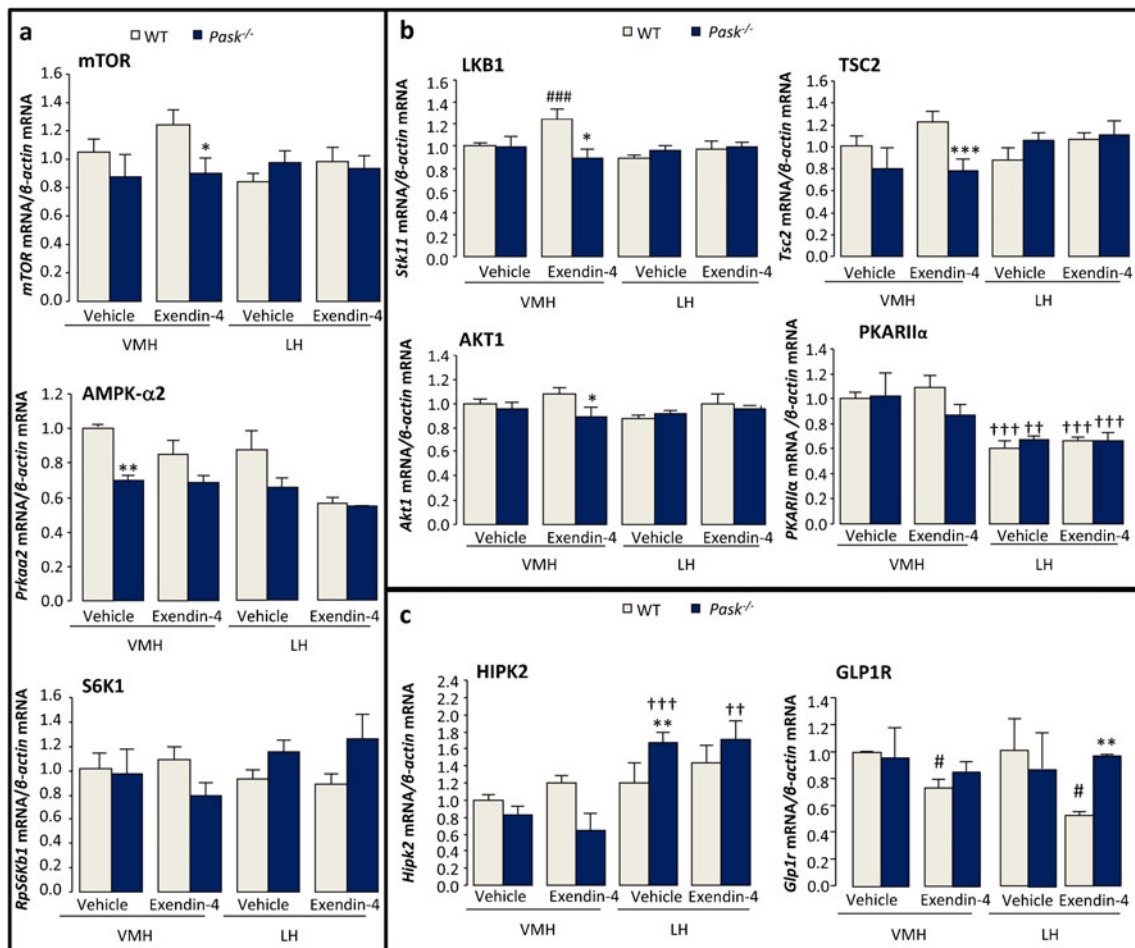


Fig. 2 Effects of PASK deficiency on the expression of several genes in VMH and LH. Quantitative real-time PCR was used to analyse the expression of several genes as shown (Online resource 1). The mRNA levels were quantified in VMH and LH from fasted C57Bl/6 wild-type and PASK-knockout mice in the presence or absence of exendin-4. The bars represent the ratios with respect to β -actin of the mRNA levels of the

different genes. The value obtained in the VMH from wild-type mice (WT) treated with a vehicle without exendin-4 was taken as 1. Results are means \pm SEM; $n=3-4$ animals per condition. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, WT vs. $Pask^{-/-}$; # $P<0.05$, ### $P<0.001$, vehicle vs. exendin-4; † $P<0.01$, †† $P<0.001$, VMH vs. LH

fasted and re-fed states in PASK-deficient mice (Fig. 5). Exendin-4 regulates hypothalamic S6K1 activation

in vivo in fasted and re-fed wild-type mice. Nevertheless, the exendin-4 effect increased S6K1 activity in fasted

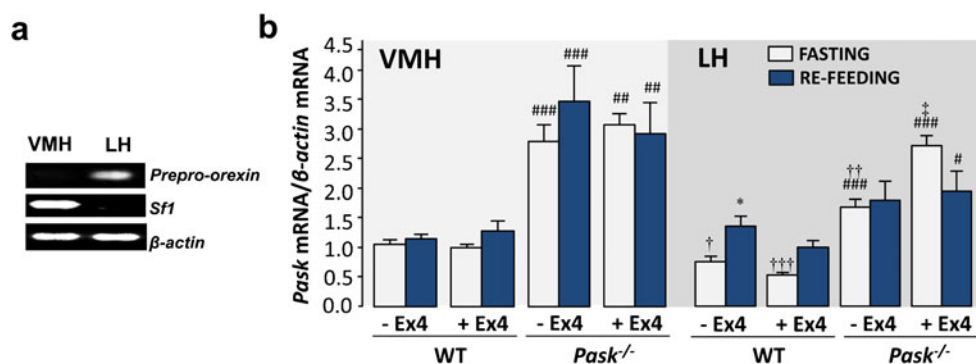


Fig. 3 Nutrients and exendin-4 modulate *Pask* gene expression in the VMH and LH from wild-type and PASK-deficient mice. **a** RT-PCR analysis of *Sf-1*, *prepro-orexin* and β -actin mRNA expression in the VMH and LH from wild-type mice. **b** *Pask* mRNA and β -actin levels were quantified by real-time RT-PCR in VMH and LH from fasted (FASTING) and re-fed (RE-FEEDING)

wild-type (WT) and PASK-deficient ($Pask^{-/-}$) mice. The data were normalized to fasting untreated wild-type mice. Results are means \pm SEM; $n=3-4$ animals per condition. * $P<0.05$, fasted vs. re-feed; # $P<0.05$, ### $P<0.001$, WT vs. $Pask^{-/-}$; † $P<0.05$, †† $P<0.01$, ††† $P<0.001$, VMH vs. LH; ‡ $P<0.05$, vehicle vs. exendin-4

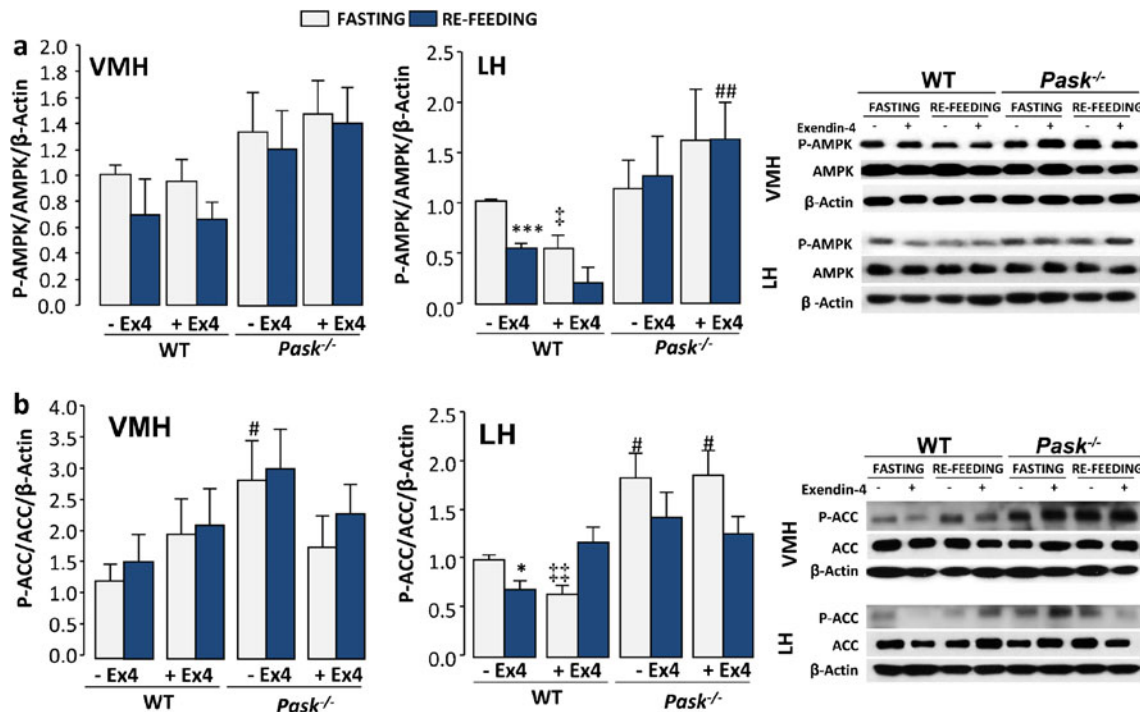


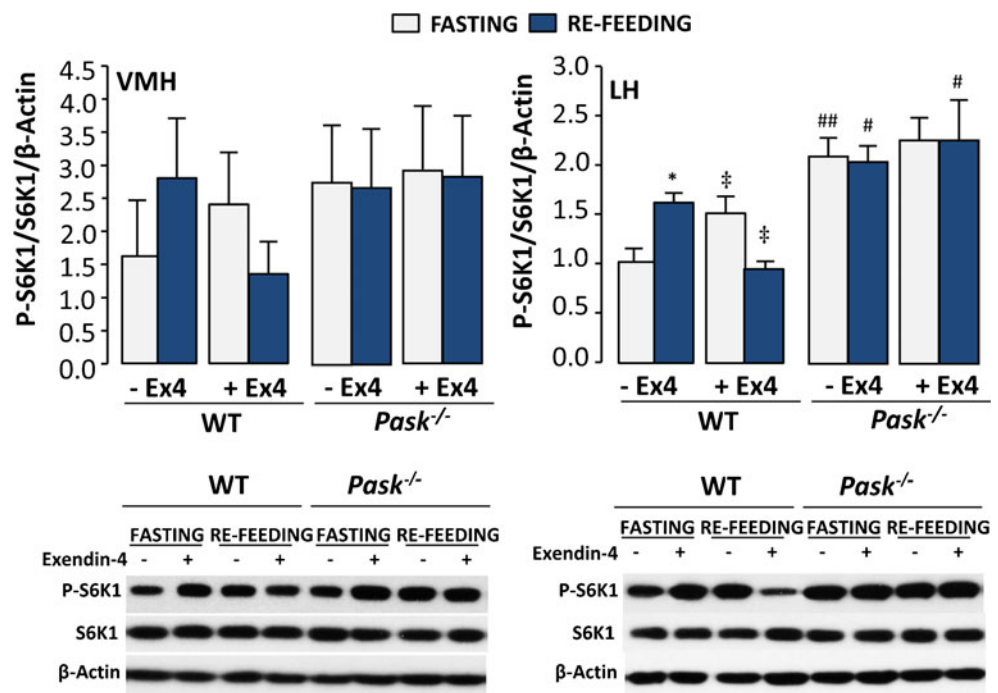
Fig. 4 Impaired effect of nutrients on AMPK and ACC activity in VMH and LH from *Pask*^{-/-} mice. **a** Immunoblot analysis of phospho-AMPK (Thr172) (P-AMPK) and total AMPK (AMPK). **b** Immunoblot analysis of phospho-ACC (Ser-79) (P-ACC) and total ACC (ACC). The blots were reprobed for β-actin to normalize the results. Bar graphs represent

means ± SEM of the densitometric values, β-actin and non-phosphorylated forms; *n*=3–4 animals per condition. Representative western blots of the graphs are also shown. The values were normalized by fasted wild-type untreated mice. **P*<0.05, ****P*<0.001, fasted vs. re-feed; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, WT vs. *Pask*^{-/-}; **P*<0.05, ††*P*<0.01, vehicle vs. exendin-4

conditions and, in contrast, 3 h of re-feeding significantly decreased S6K1 activation in LH with similar results, although no significant differences were recorded in

VMH from wild-type mice (Fig. 5). However, the exendin-4 effect on S6K1 activity was lost in *PASK*-deficient mice (Fig. 5).

Fig. 5 Impaired effects of nutrients on S6K1 activation in VMH and LH from *Pask*^{-/-} mice. Immunoblot analysis of phospho-S6K1 (Thr389) (P-S6K1) and total S6K1 (S6K1). The blots were reprobed for β-actin as a loading control. Bar graphs represent means ± SEM; *n*=3–4 of the densitometric values, expressed as the ratio with respect to β-actin and non-phosphorylated forms. Representative western blots of the graphs are also shown. The values were normalized by fasted WT untreated mice. **P*<0.05, fasted vs. re-feed; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, WT vs. *Pask*^{-/-}; †*P*<0.05, vehicle vs. exendin-4



PASK-Deficient Mouse Liver Has an Altered AMPK Response to Fasting/Re-feeding States

The activation/inactivation state of AMPK and S6K1 under fasting/re-feeding conditions was also checked in the liver to test the response of metabolic sensors in PASK-deficient mice in peripheral tissues. Our data showed no differences on AMPK α 2 and S6K1 protein expression under the conditions analysed in both PASK-deficient and wild-type mice (Fig. 6a, b). The activation of AMPK decreased after re-feeding, and exendin-4 treatment reversed this effect in wild-type mice (Fig. 6a). In contrast, AMPK activity was enhanced after re-feeding in PASK-deficient mice (Fig. 6a). The maximal activation of S6K1 was observed after re-feeding, and the presence of exendin-4 reversed the effect in wild-type and PASK-deficient mice (Fig. 6b). Nevertheless, the S6K1 activation level was higher in PASK-deficient mice (Fig. 6b).

PASK-Deficient Mice Display Altered Feeding and Blood Glucose Levels in Response to Subcutaneous Exendin-4 Treatment

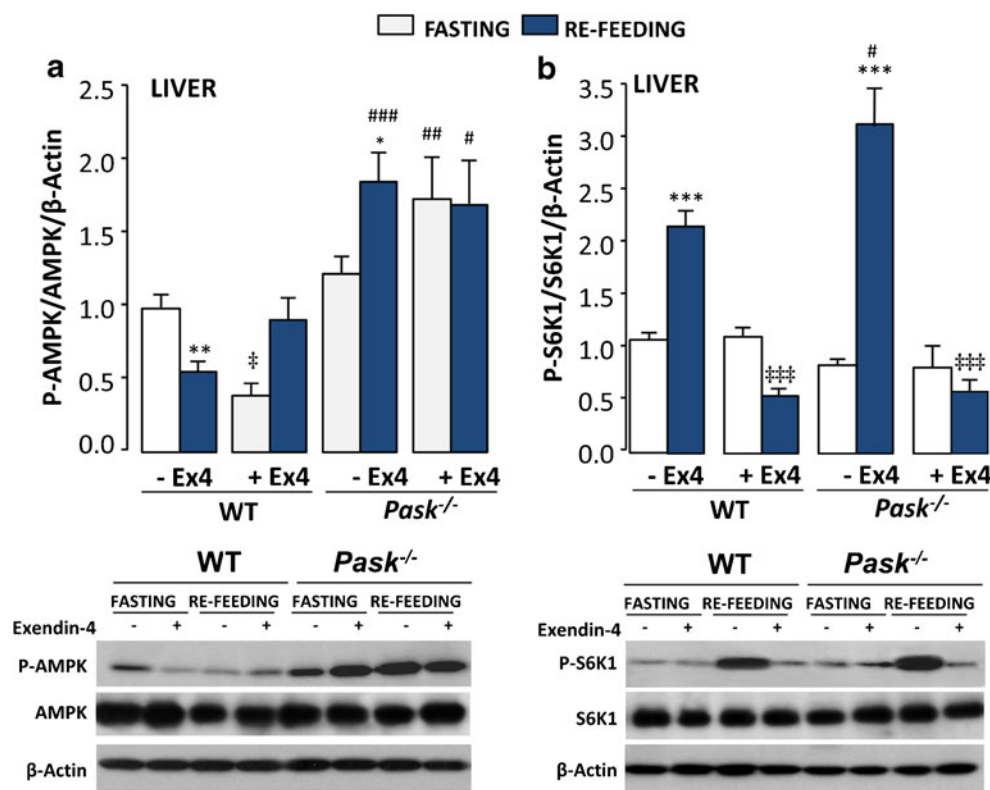
To check whether PASK is required for the exendin-4 anorexigenic effect on food intake, we tested the feeding response after subcutaneous administration of exendin-4 (250 ng/100 g body weight) in PASK-deficient mice. We have previously reported an anorexigenic effect of exendin-4 in lean and obese

rats [24] and also suggested that this effect can be explained by the regulatory effect exendin-4 has on hypothalamic AMPK and S6K1 activities [25]. Food intake was similar in wild-type and PASK-deficient mice (Fig. 7a). The treatment with exendin-4 decreased food intake by more than 75 % after 1 to 2 h of re-feeding in control wild-type mice (Fig. 7a). However, the treatment with exendin-4 reduced food intake to 45 % in PASK-deficient mice (Fig. 7a). The exendin-4 treatment was more potent for inhibiting food intake in wild-type than in PASK-deficient mice, but only after 60 min of re-feeding (Fig. 7a).

Blood glucose levels were measured in *Pask*^{-/-} mice fasted (24 and 48 h) and after re-feeding for 3 h in the absence or presence of exendin-4 (Fig. 7b). Glucose levels rise significantly after 3 h of re-feeding in both wild-type and *Pask*^{-/-} mice, compared to fasted animals, although glucose circulating levels in fasted and re-fed animals were similar in both types of mice. Treatment with exendin-4 for 1 h significantly decreased the glucose levels in fasted and re-fed conditions. After re-feeding, the presence of exendin-4 decreased blood glucose levels by ~64 and ~42 % in wild-type and *Pask*^{-/-} mice, respectively.

Serum insulin levels were similar in *Pask*^{-/-} mice compared to wild-type controls in fasted and re-fed conditions (Table 2). The administration of exendin-4 for 1 h in fasted mice increased insulin levels in both wild-type and *Pask*^{-/-} mice. By contrast, treatment with exendin-4 for 1 h in re-fed

Fig. 6 Impaired effects of nutrients on AMPK activity in liver from *Pask*^{-/-} mice. **a** Immunoblot analysis of phospho-AMPK (Thr172) (P-AMPK) and total AMPK (AMPK). **b** Immunoblot analysis of phospho-S6K1 (Thr389) (P-S6K1) and total S6K1 (S6K1). The blots were re-probed for β -actin to normalize the results. Bar graphs represent means \pm SEM; $n=3-4$ of the densitometric values, expressed as the ratio with respect to β -actin and non-phosphorylated forms. Representative western blots of the graphs are also shown. The values were normalized by fasted WT untreated mice. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, fasted vs. re-feed; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, WT vs. *Pask*^{-/-}; * $P<0.05$, *** $P<0.001$, vehicle vs. exendin-4



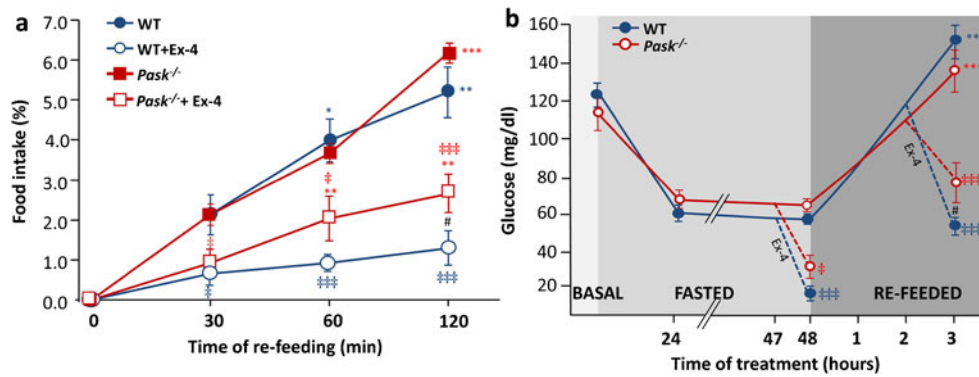


Fig. 7 Impaired effect of exendin-4 treatment in food intake and glucose circulating levels in PASK-deficient mice. **a** Effect of the subcutaneous administration of exendin-4 on food intake in fasted animals. Values are means \pm SEM cumulative food intake during three consecutive intervals for six to eight determinations per group. * P <0.05, ** P <0.01, re-feed 30 min vs. re-feed 60 and 120 min; # P <0.05, WT vs. *Pask*^{-/-}; ‡ P <0.05,

††† P <0.001, vehicle vs. exendin-4. **b** Plasma glucose levels were measured in fasted mice (24 and 48 h) and after re-feeding for 3 h in the absence or presence of exendin-4 treatment for 1 h. # P <0.05, WT vs. *Pask*^{-/-}; ‡ P <0.05, ††† P <0.001, vehicle vs. exendin-4. The determinations were made in eight animals per group

mice decreased serum insulin levels, and no significant differences were found between *Pask*^{-/-} and wild-type mice. There is a concordance between the lower decrease of blood glucose levels after exendin-4 treatment in re-fed state, with the loss of anorexigenic power of exendin-4 in *Pask*^{-/-} mice. However, no changes were observed in the incretin effect of this peptide in these mice with respect to wild-type ones.

Discussion

In this paper, we describe a role for PASK as a nutrient and hormonal sensor in hypothalamic areas involved in feeding behaviour with a different regulatory profile between VMH and LH. *Pask*^{-/-} mice also have an impaired response of AMPK and mTOR/S6K1 pathways to fasting/re-feeding conditions in VMH, LH areas and the liver. Additionally, we focused our interest on the potential role of PASK as a mediator of GLP-1/exendin-4 effects.

Previous reports analysing PASK expression in response to glucose in pancreatic beta cells are contradictory. In MIN-6

cells, PASK expression is activated by the presence of high glucose concentrations and it is necessary for the transcription of the insulin gene mediated by glucose [30]. However, an analysis of pancreatic beta cells from mice in which the kinase domain has been removed (PASK knockout) showed that *Pask* mRNA expression did not respond to elevated glucose concentrations, and no differences in glucose-stimulated insulin production were found between both types of mice [31]. Later studies indicated that PASK-deficient mice are resistant to diet-induced obesity, with this effect being related to an increase in the metabolic rate in skeletal muscle, although there was no effect on the function of other metabolic sensors (AMPK, mTOR) [7].

However, *Pask* expression is not only restricted to peripheral tissues, as it is also expressed in the central nervous system, in hypothalamic areas involved in the control of food intake [23]. Our results obtained by X-gal staining indicate that PASK was located in several hypothalamic nuclei involved in the control of food intake such as VMH, PVN, ARC and lesser extended in LH. Nonetheless, the role of PASK acting on the central nervous system and the

Table 2 Blood insulin concentrations in mice injected sc with exendin-4 in fasted or re-feeding conditions

Feeding status	Time of exendin (10 nM) treatment (h)	Insulin concentrations (ng/ml)	
		WT	<i>Pask</i> ^{-/-}
Basal	—	0.37 \pm 0.02 (n=3)	0.40 \pm 0.02 (n=3)
Fasted 48 h	—	0.22 \pm 0.05 (n=13)	0.19 \pm 0.06 (n=10)
	Exendin-4 (1 h)	0.77 \pm 0.32 (n=6)‡	1.01 \pm 0.41 (n=5)††
Re-fed 3 h	—	4.13 \pm 0.83 (n=10)***	6.10 \pm 0.99 (n=12)***
	Exendin-4 (1 h)	1.37 \pm 0.52 (n=8)‡	0.94 \pm 0.20 (n=5)‡‡

Male C57Bl/6 wild-type (WT) and PASK-deficient mice (*Pask*^{-/-}) were fasted for 48 h and then re-feeding for 3 h. Basal indicates mice housed in standard conditions, fed ad libitum, with no previous fasting period. Exendin-4 (250 ng/100 g body weight, Bachem) in saline or the saline vehicle alone (—) was subcutaneously (sc) injected during the last 1 h

* P <0.05; *** P <0.001 (fasted vs. re-fed); ‡ P <0.05; ‡‡ P <0.01 (exendin-4 treatment vs. no exendin-4 treatment)

interrelationship with other metabolic brain sensors still remain poorly understood. The important role hypothalamic metabolic sensors play in controlling food intake and maintaining the energy balance throughout the body has been extensively studied in recent years. At least two kinds of glucose sensor neurons have been described in the brain: glucose-excited neurons are located mainly in the VMH and are excited by increased glucose levels in the extracellular space, while glucose-inhibited neurons (mainly present in the LH) are excited by decreases in glucose concentrations [32]. These two areas play different roles in the control of food intake and were defined as centres of satiety and hunger, respectively. Hypothalamic AMPK and mTOR/S6K1 pathways respond to changes in glucose and other nutrients in opposite ways, and their effects on the regulation of food intake can overlap. We have also recently reported that the antidiabetogenic and anorexigenic agent exendin-4 counteracts the activation/inactivation of AMPK and mTOR/S6K1 pathways in hypothalamic areas involved in feeding behaviour, such as VMH and LH, helping to balance the proper activation of these metabolic sensors in lean and obese rats [25].

Pask mRNA levels in LH were upregulated after re-feeding. However, we observed an elevated expression of truncated PASK mRNA levels in both VMH and LH in PASK-deficient mice and a lack of regulation under fasting or re-feeding conditions. We have previously reported that the *Pask* gene was regulated by glucose and the anorexigenic peptide GLP-1, which is released from intestinal L-cells in the presence of nutrient abundance and exerts a dual role as an incretin and anorexigenic peptide reporting the nutrient status to the brain. Thus, a high glucose concentration decreased *Pask* mRNA expression in VMH and LH from rat hypothalamic organotypic cultures. However, GLP-1 treatment at elevated glucose concentrations increased *Pask* mRNA in LH [23]. The effect of high glucose and GLP-1 in LH is consistent with the results found in vivo, taking into account that the re-feeding state must be characterized by both elevated glucose and GLP-1 levels released after eating.

Another interesting finding is that PASK deficiency alters the nutrient response of AMPK and mTOR/S6K1 pathways in hypothalamic areas involved in feeding behaviour. Our data show the activation of hypothalamic AMPK in fasted state compared to re-feeding conditions, with the opposite effect in the activation level of S6K1 in LH in wild-type mice. Similar data were observed in VMH, although the differences were not significant. These data are consistent with the results previously described in rodents [21, 25, 33, 34]. However, exendin-4 treatment in fasted animals induced the activation of both metabolic sensors AMPK and S6K1 in a similar way to the re-feed condition, although exendin-4 treatment decreased blood glucose levels. These data suggest that the exendin-4 effect prevails over the glucose regulatory effect.

In contrast, the treatment with exendin-4 in re-feeding conditions decreased glucose circulating levels, and the activation of S6K1 also decreased significantly, although AMPK activity remained low. Although previous results indicated that there is no relationship between PASK deficiency and the activity of other metabolic sensors in the liver or muscle under the conditions studied [7], we observed that PASK deficiency impaired AMPK and S6K1 response to both the nutritional state and exendin-4 treatment in hypothalamic areas. In this way, AMPK and S6K1 showed an elevated activation state in fasted and re-fed conditions, respectively, in both LH and VMH. Additionally, in this study, we observed that the regulatory effect of exendin-4 in both AMPK and S6K1 was lost in PASK-deficient mice. A similar effect was observed in PASK knockdown neuroblastoma cells, suggesting that PASK is implicated in some GLP-1 actions [23]. We also observed that AMPK response to nutrients was altered in peripheral tissues as the liver in PASK-deficient mice. In fasted animals, the activation was similar to wild-type mice in accordance with the data reported by Hao et al. [7]. Nevertheless, the activation level of AMPK increased after re-feeding, and activation of S6K1 was also higher than in control mice. Then, AMPK and mTOR were both activated simultaneously after re-feeding while GSK3 β was inhibited in the liver from PASK-deficient mice (data not shown). It is accepted that the activation of AMPK in the liver and muscle can cause a decrease in blood glucose and lipid levels [35]. The elevated AMPK activity may also explain the increased glucose and lipid oxidation previously reported [7].

We have also confirmed here that the anorexigenic effect of exendin-4 was partially inhibited and yet still observed in PASK-deficient mice. The anorexigenic effect of exendin-4 was reduced in PASK-deficient mice. This finding is also in accordance with the significantly higher blood glucose levels found after exendin-4 treatment in PASK-deficient mice. Thus, PASK-deficient mice record a higher blood glucose concentration and similar insulin levels after exendin-4 administration during the last hour. However, glucose and insulin circulating levels in fasted and re-fed conditions were not significantly altered in PASK-deficient mice, confirming previous results of food intake and those obtained with a glucose tolerance test [7]. Nevertheless, our data suggest that some of the exendin-4 effects are mediated through AMPK, mTOR/S6K1 and PASK pathways that are impaired, but other hypothalamic signalling pathways are still active in PASK-deficient mice.

The activation of mTOR in the hypothalamus has been related to anorexia [22, 34, 36, 37]. However, mice with a TSC1 deficiency in the hypothalamus and pro-opiomelanocortin (POMC) neurons, which promotes mTOR activation, develop an orexigenic response [38]. It has also been reported that the orexigenic effect of ghrelin, one of the intestinal peptides, is mediated by the hypothalamic mTOR

pathway [39]. Ghrelin also activates the AMPK and stimulates food intake [40, 41]. Both AMPK and mTOR/S6K1 pathways have opposite cellular effects for regulating metabolism and cell growth, for example. Thus, AMPK and mTOR respond to changes in glucose and other nutrients in opposite ways, and their effects on the regulation of food intake may overlap. Along these lines, previous data have reported interrelations between both routes. The activation of AMPK induces the inhibition of mTOR activity and also that of S6K1 phosphorylates while inhibiting the activity of AMPK α 2 in the hypothalamus [20]. AMPK and mTOR in PASK-deficient mice are both activated simultaneously in the areas involved in the control of food intake, suggesting that the PASK function could be critical for maintaining both the regulation of the on/off activation of both pathways and the regulatory role of exendin-4 in food intake. Inoki et al. reported that inhibition of mTOR by AMPK activation required a coordinated phosphorylation of TSC2 by AMPK and GSK3 β [42]. In accordance, we observed that GSK3 β was more inhibited after re-feeding in liver from PASK-deficient mice (data not shown). These results would suggest one possible explanation for the lack of coordination between AMPK activation and mTOR/S6K1 inhibition in PASK-deficient mice although subsequent studies will be needed to clarify this hypothesis. The deregulation of these signalling pathways might be involved in the development of obesity and type 2 diabetes. A mutation in the *PASK* gene has been described in the early onset of diabetes, which modulates glucose-stimulated insulin secretion [43]. A decrease in PASK expression was also found in pancreatic islets from human with type 2 diabetes [8]. These data seem to contradict the resistance to the development of obesity previously described in PASK-deficient mice [7].

The importance of PASK and its relationship with diseases such as obesity and type 2 diabetes may also depend on its ability to regulate AMPK and mTOR/S6K1 activities, as altered responses of AMPK could also be involved in obesity and type 2 diabetes [44]. Several examples have been reported: the use of AMPK-knockout mice deficient in the catalytic subunit has shown that while AMPK α 1^{-/-} mice have no metabolic alterations, AMPK α 2^{-/-} mice are insulin-resistant, with no apparent changes in body weight or food intake [45–47]. Specific deletions of AMPK α 2 in hypothalamic POMC neurons or in hypothalamic agouti-related peptide (AgRP) neurons modified the feeding behaviour and the maintenance of energy and body weight homeostasis. Thus, the AMPK α 2 KO in POMC neurons developed obesity and lower energy expenditure [48]. By contrast, mice with an AMPK α 2 deficiency in AgRP neurons developed an age-dependent lean phenotype [48]. Furthermore, it has also been reported that AMPK β 1-knockout mice had a lower food intake and reduced total body weight [49]. Neuronal protein tyrosine phosphatase 1B-deficient mice are resistant to diet-induced obesity, showing lower hypothalamic AMPK activation and higher energy expenditure [50]. S6K1-deficient mice are also resistant to diet-induced obesity [51]. In contrast,

regarding PASK-deficient mice that are also resistant to diet-induced obesity, we observed that mTOR/S6K1 pathway is highly activated in the hypothalamus, and the AMPK is also activated, which furthermore contradicts the data reported on PASK knockdown by siRNA in cultured myoblasts that are posited to cause increased glucose and palmitate oxidation and elevated cellular ATP levels [7]. It also contradicts our data on PASK knockdown neuroblastoma cells in which we observed increased ATP levels and the loss of AMPK activation at low glucose levels [23].

The interpretation of the phenotypes in knockout mice is difficult due the redundancy of regulatory mechanisms. Several hypothalamic sensors detect nutrient levels, which could compensate and interrelate with each other, as well as the presence of many anorexigenic peptides that control their activation and inactivation in order to regulate feeding behaviour and energy homeostasis and maintain body weight. However, in vitro studies, where the compensatory mechanisms are limited, have revealed that PASK plays as a nutrient sensor in neuroblastoma and hypothalamic cells [23]. We also show here how PASK is involved in the control of the gene expression of several genes, such as *Ampk α 2* and *Hipk2* and its role as a mediator of the effects of exendin-4 on the regulation of genes coding to LKB1, TSC2, AKT1, mTOR, eEF1- α 1 and nNOS1. The effects of PASK deficiency were different in VMH and LH. These hypothalamic areas contain different distributions of neuron glucose responsive (GE) or glucose inhibited (GI) predominant in VMH and LH, respectively. These differences can also explain changes in the expression of PASK that was higher in VMH than that in LH. For this reason, we cannot rule out that PASK deficiency may have different effects or may be compensated differently in both areas. In short, our results show that PASK is a nutrient sensor in hypothalamic areas involved in feeding behaviour, and the PASK function is decisive for maintaining the nutrient effect on hypothalamic AMPK and mTOR/S6K1 pathways. Furthermore, PASK is required for the correct signalling of GLP-1/exendin-4.

Acknowledgments This work was supported by grants from Spain's Ministry of Science and Innovation—MICINN (SAF2006-0475 and SAF2009-11297), the Complutense University-Banco Santander Funding Programme for the Creation and Consolidation of Research Teams (GR58/08, GR35/10A, GR35/10B and GR42/10), Mutua Madrileña Medical Research Foundation and the IODURE project, and the CIBER for Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM) of the Carlos III Health Institute (ISCIII) (Ministry of Science and Innovation). We wish to thank Marketa Zemanova for her excellent technical assistance.

References

1. Hao HX, Rutter J (2008) The role of PASK kinase in regulating energy metabolism. *IUBMB Life* 60(4):204–209

2. Schläfli P, Bortner E, Spielmann P, Wenger RH (2009) The PAS-domain kinase PASKIN: a new sensor in energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 66(5):876–883
3. MacDonald PE, Rorsman P (2011) Per-arn-t-sim (PAS) domain kinase (PASK) as a regulator of glucagon secretion. *Diabetologia* 54(4):719–721
4. Smith TL, Rutter J (2007) Regulation of glucose partitioning by PAS kinase and Ugp1 phosphorylation. *Mol Cell* 26(4):491–499
5. Grose JH, Smith TL, Sabic H, Rutter J (2007) Yeast PAS kinase coordinates glucose partitioning in response to metabolic and cell integrity signaling. *Embo J* 26(23):4824–4830
6. Katschinski DM, Marti HH, Wagner KF, Shibata J, Eckhardt K, Martin F, Depping R, Paasch U, Gassmann M, Ledermann B, Desbaillets I, Wenger RH (2003) Targeted disruption of the mouse PAS domain serine/threonine kinase PASKIN. *Mol Cell Biol* 23(19):6780–6789
7. Hao HX, Cardon CM, Swiatek W, Cooksey RC, Smith TL, Wilde J, Boudina S, Abel ED, McClain DA, Rutter J (2007) PAS kinase is required for normal cellular energy balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39):15466–15471
8. da Silva XG, Farhan H, Kim H, Caxaria S, Johnson P, Hughes S, Bugliani M, Marselli L, Marchetti P, Birzele F, Sun G, Scharfmann R, Rutter J, Siniakowicz K, Weir G, Parker H, Reimann F, Gribble FM, Rutter GA (2011) Per-arn-t-sim (PAS) domain-containing protein kinase is downregulated in human islets in type 2 diabetes and regulates glucagon secretion. *Diabetologia* 54(4):819–827
9. Rutter GA, Da Silva XG, Leclerc I (2003) Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J* 375(Pt 1):1–16
10. Hardie DG, Carling D, Carlson M (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67:821–855
11. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(4):251–262
12. Foster KG, Fingar DC (2010) Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* 285(19):14071–14077
13. Alessi DR, Pearce LR, Garcia-Martinez JM (2009) New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal* 2(67):pe27
14. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1):21–35
15. Proud CG (2002) Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem* 269(22):5338–5349
16. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15(7):807–826
17. Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115(5):577–590
18. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30(2):214–226
19. Zheng M, Wang YH, Wu XN, Wu SQ, Lu BJ, Dong MQ, Zhang H, Sun P, Lin SC, Guan KL, Han J (2011) Inactivation of Rheb by PRAK-mediated phosphorylation is essential for energy-depletion-induced suppression of mTORC1. *Nat Cell Biol* 13(3):263–272
20. Dagon Y, Hur E, Zheng B, Wellenstein K, Cantley LC, Kahn BB (2012) p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate Leptin's effect on food intake. *Cell Metab* 16(1):104–112
21. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Foulfelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428(6982):569–574
22. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312(5775):927–930
23. Hurtado-Carneiro V, Roncero I, Blazquez E, Alvarez E, Sanz C (2013) PAS kinase as a nutrient sensor in neuroblastoma and hypothalamic cells required for the normal expression and activity of other cellular nutrient and energy sensors. *Mol Neurobiol* 48(3):904–920
24. Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Maestre O, Gomez R, Munoz RM, Eng J, Blazquez E (2000) Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism* 49(6):709–717
25. Hurtado-Carneiro V, Sanz C, Roncero I, Vazquez P, Blazquez E, Alvarez E (2012) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) can reverse AMP-activated protein kinase (AMPK) and S6 kinase (P70S6K) activities induced by fluctuations in glucose levels in hypothalamic areas involved in feeding behaviour. *Mol Neurobiol* 45(2):348–361
26. Paxinos G, Watson C (2004) The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, New York
27. Franklin KBJ, Paxinos G (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, San Diego
28. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156–159
29. Navarro M, Rodriguez de Fonseca F, Alvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gomez R, Eng J, Blazquez E (1996) Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem* 67(5):1982–1991
30. da Silva XG, Rutter J, Rutter GA (2004) Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic duodenum homeobox 1 gene expression by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(22):8319–8324
31. Bortner E, Niessen M, Zuellig R, Spinas GA, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH (2007) Glucose-stimulated insulin production in mice deficient for the PAS kinase PASKIN. *Diabetes* 56(1):113–117
32. Dunn-Meynell AA, Routh VH, Kang L, Gaspers L, Levin BE (2002) Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* 51(7):2056–2065
33. Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, Yun JY, Namgoong IS, Ha J, Park IS, Lee IK, Viollet B, Youn JH, Lee HK, Lee KU (2004) Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 10(7):727–733
34. Cota D, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ (2008) The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci* 28(28):7202–7208
35. Long YC, Zierath JR (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116(7):1776–1783
36. Reed AS, Unger EK, Olofsson LE, Piper ML, Myers MG Jr, Xu AW (2010) Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes* 59(4):894–906
37. Villanueva EC, Munzberg H, Cota D, Leshan RL, Kopp K, Ishida-Takahashi R, Jones JC, Fingar DC, Seeley RJ, Myers MG Jr (2009) Complex regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 in the basomedial hypothalamus by leptin and nutritional status. *Endocrinology* 150(10):4541–4551
38. Mori H, Inoki K, Munzberg H, Opland D, Faouzi M, Villanueva EC, Ikenoue T, Kwiatkowski D, MacDougald OA, Myers MG Jr, Guan KL (2009) Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell Metab* 9(4):362–374
39. Martins L, Fernandez-Mallo D, Novelle MG, Vazquez MJ, Tena-Sempere M, Nogueiras R, Lopez M, Dieguez C (2012) Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. *PLoS One* 7(10):e46923

40. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ (2004) AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279(13):12005–12008
41. Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, Williams LM, Hawley SA, Hardie DG, Grossman AB, Korbonits M (2005) Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280(26):25196–25201
42. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126(5):955–968
43. Semplici F, Vaxillaire M, Fogarty S, Semache M, Bonnefond A, Fontes G, Philippe J, Meur G, Diraison F, Sessions RB, Rutter J, Poitout V, Froguel P, Rutter GA (2011) Human mutation within Per-Arnt-Sim (PAS) domain-containing protein kinase (PASK) causes basal insulin hypersecretion. *J Biol Chem* 286(51):44005–44014
44. Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB (2006) Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 281(28):18933–18941
45. Jorgensen SB, Viollet B, Andreelli F, Frosig C, Birk JB, Schjerling P, Vaulont S, Richter EA, Wojtaszewski JF (2004) Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J Biol Chem* 279(2):1070–1079
46. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloan A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S (2003) The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* 111(1):91–98
47. Viollet B, Athes Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L (2009) AMPK: lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci* 14:19–44
48. Claret M, Smith MA, Batterham RL, Selman C, Choudhury AI, Fryer LG, Clements M, Al-Qassab H, Heffron H, Xu AW, Speakman JR, Barsh GS, Viollet B, Vaulont S, Ashford ML, Carling D, Withers DJ (2007) AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 117(8):2325–2336
49. Dzamko N, van Denderen BJ, Hevener AL, Jorgensen SB, Honeyman J, Galic S, Chen ZP, Watt MJ, Campbell DJ, Steinberg GR, Kemp BE (2010) AMPK beta1 deletion reduces appetite, preventing obesity and hepatic insulin resistance. *J Biol Chem* 285(1):115–122
50. Xue B, Pulinkunnil T, Murano I, Bence KK, He H, Minokoshi Y, Asakura K, Lee A, Haj F, Furukawa N, Catalano KJ, Delibegovic M, Balschi JA, Cinti S, Neel BG, Kahn BB (2009) Neuronal protein tyrosine phosphatase 1B deficiency results in inhibition of hypothalamic AMPK and isoform-specific activation of AMPK in peripheral tissues. *Mol Cell Biol* 29(16):4563–4573
51. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431(7005):200–205

On line resource 1. Identification of probes used in the different gene expression assays

MULTIPLE TAQMAN® GENE EXPRESSION ASSAY

Gene Symbol	Gen Identification	Mouse probe identification (Taq Man® Assay)	Protein name
<i>Rn 18s</i>	19791	Hs99999901_s1	18S
<i>Actb</i>	11461	Hs99999903_m1	β-ACTIN
<i>Pask</i>	269224	Mm00435916_m1	PASK
<i>Prkar2a</i>	19087	Mm00435916_m1	PKA RIIα
<i>Rps6kb1</i>	72508	Mm01310033_m1	S6K1
<i>Mtor</i>	56717	Mm00444968_m1	mTOR
<i>Eif4b</i>	75705	Mm00778003_s1	eIF-4B
<i>Rps6</i>	20104	Mm02342456_g1	S6
<i>Eef2k</i>	13631	Mm00432996_m1	eEF-2K/CaMK
<i>Eef1a1</i>	13627	Mm01973893_m1	eEF1-α1
<i>Stk11</i>	20869	Mm00488470_m1	LKB1
<i>Pdk1</i>	228026	Mm00499855_m1	PDK1
<i>Tsc2</i>	22084	Mm00442004_m1	TSC2
<i>Akt1</i>	11651	Mm01331624_m1	AKT1
<i>nNos1</i>	18125	Mm00435175_m1	nNOS
<i>Hipk2</i>	15258	Mm00439329_m1	HIPK2
<i>Gapdh</i>	14433	Mm99999915_g1	GAPDH

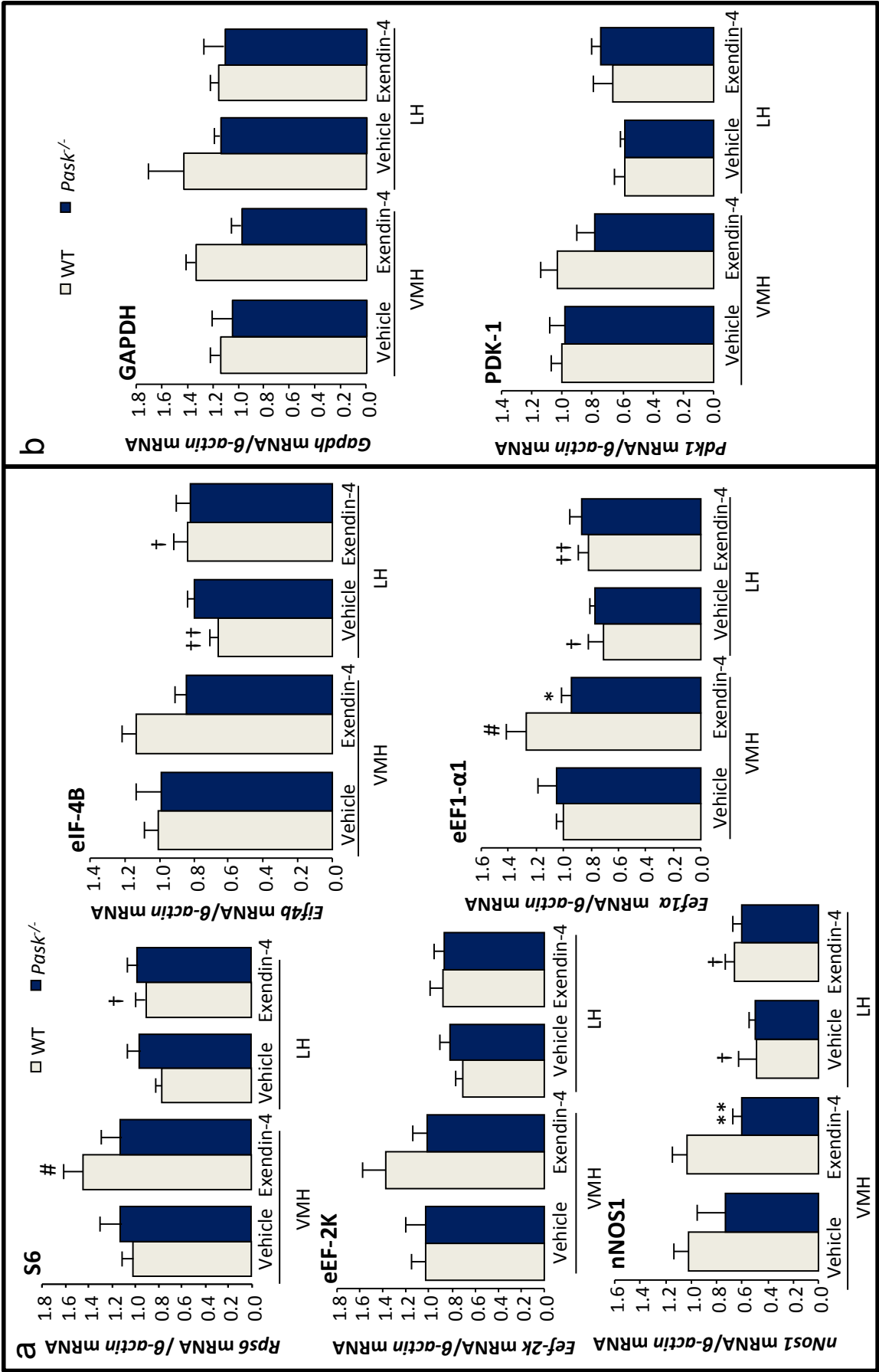
REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (TAQMAN® ASSAY)

Gene Symbol	Primers (Forward and reverse)	Taqman probe	Protein name
<i>Rat Prkaa2</i>	5'-GTGGATCGCCAAATTA TGCA-3' 5'-GGGAGGGTGCCACA GAGAA-3'	6-FAM-TAC AGC CTT CTT GAC ATG A-MGB	AMPKα2
Mouse Prkaa2		Mm 01264789_m1	AMPKα2
Rat Pask	5'-TGGACTGCAGTGGAGAA GGGA-3' 5'-ATCCTCTAAAACCTTCT CCTTCTTA ATAAA-3'	6-FAM-ACA AAG AGA TGG TGG TGA A-MGB	PASK

POLYMERASE CHAIN REACTION

Mouse <i>Glp-1r</i>		Mm 00445292_m1	GLP-1R
Mouse- <i>Rat Sf-1</i>	5'-AGCTGCTGGTGTGGACCA-3' 5'-TCCAGTAACCAGCAGGATGCT-3'		SF-1
Mouse <i>Prepro-orexin</i>	5'-CTCAGACTCCTTGGGT ATTT-3' 5'-CAATCCGGAGAGAGA TGGT -3'		PREPRO-OREXIN

On line resource 2.



Effects of PASK deficiency on the expression of several genes in the VMH and LH. Quantitative real-time PCR was used to analyze the expression of several genes as shown (Online resource 1). The mRNA levels were quantified in VMH and LH from fasted C57Bl/6 wild-type and PASK knockout mice in the presence or absence of extending-4. The bars represent the ratios respect to β -actin of the mRNA levels of the different genes. The value obtained in VMH from wild-type mice (WT) treated with a vehicle without extending-4 was taken as 1. Results are means \pm SEM; n=3-4 animals per condition. *P<0.05, **P<0.01 WT vs. Pask; #P<0.05 vehicle vs. extending-4; †P<0.05, ††P<0.01 VMH vs. LH.

DISCUSIÓN

A lo largo de la evolución los organismos vivos han estado continuamente sometidos a un aporte irregular de nutrientes, por lo que la capacidad de mantener el equilibrio energético durante periodos de privación de alimento ha sido crítica para su supervivencia. Esta presión selectiva les ha permitido desarrollar complejos sistemas para mantener la homeostasis energética, almacenando sustratos energéticos en periodos de aporte de alimento y reduciendo el gasto cuando éste es escaso (Long and Zierath, 2006).

Este sistema homeostático implica la existencia de sensores que detectan el estado metabólico y energético equilibrando el flujo de ingreso y gasto a través de vías de señalización específicas. En humanos, estos sistemas sensores se encuentran en múltiples tejidos y órganos, y cualquier defecto asociado con esas vías puede dar lugar a trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes tipo 2 (Xu et al., 2012).

Dos de los sensores metabólicos más estudiados son las serina-treonina quinasas AMPK y mTOR. En mamíferos, la quinasa AMPK actúa como un sensor energético y regulador clave del metabolismo que se activa en respuesta a un incremento del ratio AMP/ATP en la célula. La AMPK controla el metabolismo de la glucosa y de los lípidos e integra circuitos de señalización entre tejidos periféricos y el hipotálamo regulando la ingesta y el gasto energético de todo el organismo. mTOR funciona como un sensor de abundancia de nutrientes que controla la síntesis de proteínas y el crecimiento y metabolismo celular y es una de las dianas de la AMPK (Xu et al., 2012). Estudios recientes indican que, al igual que la AMPK y mTOR, PASK se comporta como una proteína respondedora de nutrientes que coordina la utilización de glucosa en respuesta al estado energético celular y a las demandas metabólicas (Cardon and Rutter, 2012).

El control de la ingesta de alimentos es uno de los procesos metabólicos más complejos que tiene lugar en el organismo, y el hipotálamo, concretamente, desempeña un papel clave en esta regulación. Distintas áreas hipotalámicas, entre ellas VMH y LH, poseen neuronas sensoras de glucosa con mecanismos especiales para la detección de las alteraciones en las reservas energéticas desencadenando así respuestas metabólicas y de comportamiento diseñadas para mantener el equilibrio energético (Leibowitz and Wortley, 2004). En estas neuronas están presentes proteínas quinasas tales como AMPK y mTOR, que actúan como sensores metabólicos, así como receptores para péptidos orexigénicos y anorexigénicos.

El VMH (centro de la saciedad) inhibe el apetito debido a la presencia de elevada cantidad de neuronas que expresan receptores de péptidos anorexigénicos y neuronas que se activan cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados (Hillebrand et al., 2002; Williams et al., 2000). En cambio, en el LH (centro del hambre) se encuentran neuronas que expresan orexinas, MCH, así como neuronas glucosensitivas que son estimuladas cuando disminuye la concentración de glucosa y, por lo tanto, inducen un incremento de la ingesta (Peyron et al., 1998; Qu et al., 1996).

El GLP-1 induce señales que reducen la ingesta de alimentos y agua y, por ello, se le considera un péptido anorexigénico. Pero, además, este péptido tiene efectos antidiabetogénicos, ya que entre otras acciones estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa en las células β -pancreáticas. El estudio y comprensión de las vías de señalización y los mecanismos de acción del GLP-1 son cruciales para el desarrollo de tratamientos farmacológicos más eficaces en el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo 2.

Los objetivos de este trabajo han sido: i) estudiar la respuesta de los sensores metabólicos AMPK y mTOR/S6K1 a cambios nutricionales, ii) analizar la función de la PASK como sensor de nutrientes y iii) estudiar el papel regulador del péptido anorexigénico GLP-1 comparando sus efectos en las áreas VMH y LH, que desempeñan funciones opuestas en la regulación de la ingesta alimentaria.

Se ha descrito que los niveles de expresión de las diferentes subunidades catalíticas y reguladoras de la AMPK en el SNC varían en función de su distribución en las diferentes regiones cerebrales y en las distintas localizaciones subcelulares (Culmsee et al., 2001; Turnley et al., 1999). Nosotros, mediante estudios de inmunohistoquímica, hemos podido confirmar la presencia de la forma activa de la subunidad α de AMPK en hipotálamo y tronco cerebral.

La AMPK hipotalámica es un sensor de energía celular (Hardie et al., 2006) implicado en la regulación de la ingesta, ya que su activación promueve la ingesta de alimentos, mientras que la disminución de su actividad enzimática está asociada a hipofagia (Minokoshi et al., 2004). Sin embargo, la hipoglucemia hipotalámica induce la activación de AMPK, específicamente en el VMH y PVN pero no en el LH (Mountjoy and Rutter, 2007).

La AMPK es un sensor capaz de detectar variaciones nutricionales incluyendo los niveles de glucosa (Mountjoy and Rutter, 2007). En concreto, los resultados de varios estudios han indicado que la glucosa provoca una disminución de la actividad de la AMPK debido a un menor estado de fosforilación en el residuo Thr 172 de la subunidad catalítica α . Esto se ha observado en distintos tejidos de mamífero y tipos celulares, como células β -pancreáticas (da Silva Xavier et al., 2000; Salt et al., 1998), músculo esquelético (Itani et al., 2003), neuronas (Mountjoy et al., 2007) y adipocitos (Djouder et al., 2010). Además, hay estudios que indican que la fosforilación de la glucosa es estrictamente necesaria, pero no suficiente, para que esta señalización ocurra y que, por tanto, la glucosa debe además metabolizarse.

Los datos obtenidos en este trabajo señalan que en células de neuroblastoma (N2A) e hipotalámicas (GT1-7), la AMPK detecta y responde a alteraciones en los niveles de glucosa en el medio de cultivo. Las bajas concentraciones de glucosa estimulan la fosforilación de la AMPK y las elevadas concentraciones disminuyen la activación de la misma. De igual forma, el ayuno prolongado incrementa la actividad de AMPK en VMH y LH.

Algunos estudios han demostrado que las células GT1-7 mimetizan estrechamente el comportamiento de las neuronas GE hipotalámicas sensibles a glucosa. La supresión de la actividad de la AMPK en estas células inhibe el comportamiento normal de sensibilidad a la glucosa y puede contribuir a defectos en la detección de la hipoglucemia. Este efecto posiblemente se produzca por alteraciones en la actividad de la proteína desacoplante 2 (UCP-2) (Beall et al., 2012).

La S6K1 es sustrato directo del complejo mTOR, es decir, el análisis de la actividad de esta quinasas es fiel reflejo de la actividad del complejo mTOR. Determinados estudios indican que mTOR presenta una función opuesta a la AMPK en el control de la conducta alimentaria (Xu et al., 2012). Estas investigaciones indican que los agentes o tratamientos que causan la activación de la AMPK inhiben la vía mTOR/S6K1, pudiendo existir una relación inversa entre ambos sensores energéticos (Bolster et al., 2002; Kimura et al., 2003). Por tanto, el complejo mTOR es una de las dianas de la AMPK y cuando existen concentraciones elevadas de nutrientes la vía mTOR/S6K1 se activa causando una inhibición de la ingesta de alimentos. Esto ha sido confirmado por Cota y cols. que

demonstraron la existencia de mTOR y S6K1 activas en el ARC y observaron que la actividad del complejo mTOR disminuye cuando los animales son ayunados, siendo recuperada cuando se re-alimentan (Cota et al., 2006).

Nuestros resultados van en concordancia con esta idea, dado que la activación de la S6K1 en las células neuronales N2A y GT1-7 se produce en respuesta a la elevación de la concentración de glucosa. Además, un ayuno prolongado conlleva una inactivación de la S6K1 en las áreas VMH y LH, mientras que la re-alimentación de los animales activa esta quinasa.

Se ha visto que en ratas normoglucémicas la concentración de glucosa extracelular en el cerebro es aproximadamente de 2,5 mM, y esta concentración se ve incrementada aproximadamente a 4,5 mM cuando los niveles de glucosa en sangre están en torno a los 15 mM (Silver and Erecinska, 1994). Resultados obtenidos con posterioridad, utilizando células de neuroblastoma de ratón, indican que la concentración de ATP aumenta notablemente a concentraciones de 1 a 5 mM de glucosa y por encima de 5 mM la concentración de ATP se mantiene estable (Lee et al., 2005). En nuestros estudios *in vitro* hemos utilizado 0,5 mM como concentración baja de glucosa y 10 mM como concentración alta. Podría estimarse que 10 mM de glucosa es una concentración demasiado alta en el cerebro, sin embargo, los niveles de glucosa en sangre en los animales obesos pueden superar los 20 mM de glucosa (Rodríguez de Fonseca et al., 2000).

La concentración de glucosa que contenía el medio de cultivo habitual de las líneas celulares N2A y GT1-7 utilizadas para nuestros estudios fue de 25 mM, una concentración más alta que la fisiológica. Estas condiciones de cultivo son las recomendadas para el crecimiento de estas líneas celulares y han sido utilizadas en estudios previos (Mellon et al., 1990; Sanz et al., 2008). Además, en estas condiciones las células no mostraron signos aparentes de glucotoxicidad, tal y como se había observado en otros estudios (Manzoni et al., 2011). Dado que estas condiciones no son similares a las fisiológicas, las células fueron ayunadas previamente en medio sin suero y con 0,5 mM de glucosa durante 2 h con el fin de iniciar la estimulación celular en condiciones más óptimas.

Los estudios iniciales encaminados a detectar la actividad enzimática de estos sensores metabólicos mediante cuantificación de la forma activa (forma fosforilada) de la AMPK o S6K1, fueron un tanto desconcertantes. Observamos que

el nivel de fosforilación de la proteína AMPK aumentaba incluso después de la lisis celular en presencia del tampón de muestra Laemmli. *In vivo*, las quinasas y fosfatasas modulan la actividad enzimática alterando el estado de fosforilación de las proteínas. Algunos autores han observado que se pueden producir modificaciones en la medición de la fosforilación como resultado del procedimiento empleado para sacrificar animales o la metodología utilizada en el procesamiento celular, por lo que los resultados obtenidos no reflejan necesariamente la fosforilación *in vivo* (Scharf et al., 2008). Estos datos nos proporcionaron la clave para optimizar y poner a punto el procedimiento empleado para procesar las muestras. Tras abordar varias metodologías, en nuestro trabajo de investigación, se constata que el procesamiento óptimo de las muestras tras su lisis conlleva un corto tratamiento de microondas con el fin de bloquear toda actividad enzimática y mantener los niveles de fosforilación de las proteínas.

Igualmente, nuestros resultados establecen que la activación de la AMPK y la S6K1 es dependiente del tiempo de incubación con las diferentes concentraciones de glucosa, en especial para la S6K1, cuya activación es observada a partir de las 3-4 horas de incubación con alta concentración de glucosa.

Un hallazgo interesante es que el GLP-1 modula la actividad de AMPK y la S6K1 en células N2A y GT1-7, así como en las áreas hipotalámicas estudiadas, y esta modulación depende del estado de activación de estas quinasas. Así, se observó que este péptido disminuye la actividad de la AMPK y de la S6K1 a baja y alta concentración de glucosa respectivamente, es decir, cuando estas proteínas alcanzan su máxima activación y sólo en este caso, puesto que no modifica la actividad de estas quinasas cuando éstas se encuentran menos activas.

En este trabajo, además, se confirma la idea de que los efectos de la glucosa en la AMPK y mTOR/S6K1 son específicos de la región hipotalámica (VMH y LH), respondiendo de diferente forma en cada una de las áreas. Esto fue corroborado en modelos *in vitro*, utilizando rodajas hipotalámicas, y también *in vivo*, en ratas Zucker obesas y controles delgadas. Por otro lado, se observó que el GLP-1 es capaz de modular las actividades de la AMPK y mTOR/S6K1 dependiendo del estado de activación de estas quinasas.

En investigaciones previas del grupo, el uso de rodajas hipotalámicas de rata en cultivo ha permitido el abordaje de varios estudios experimentales realizados *in vitro* pero preservando, en parte, la arquitectura del tejido y las conexiones funcionales. Además, en estos estudios se ha observado que se mantiene una expresión selectiva de c-Fos (marcador de actividad neuronal) en las áreas VMH y LH en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa (Sanz et al., 2007) similar a la actividad funcional encontrada *in vivo* (Solomon et al., 2006). Por lo ello, la utilización de cultivos organotípicos de rodajas hipotalámicas nos proporcionó una herramienta experimental muy útil al tener la capacidad de realizar planteamientos *in vitro* usando un modelo cercano al fisiológico.

Utilizando el mismo enfoque experimental, en este trabajo se observa que los niveles elevados de glucosa disminuyen la expresión de la AMPK α 2, específicamente en el LH. Previamente, se han documentado cambios en la expresión de la AMPK en función de los niveles de glucosa, así en ratas en ayuno se produce un incremento en la expresión del ARNm de la AMPK α 2 hipotalámica (McCrimmon et al., 2008), y la administración icv del GLP-1 atenúa dicho efecto (Seo et al., 2008).

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con GLP-1 es capaz de modular la expresión de AMPK α 2 y de producir una respuesta distinta en el LH en comparación con el VMH. Este resultado puede ser explicado en base a las diferentes funciones de estas dos áreas en el control de la ingesta de alimentos. La regulación de la expresión de la AMPK por el GLP-1, junto con sus acciones en la actividad de ambos sensores metabólicos, sugiere que el efecto anorexigénico del GLP-1 podría estar mediado, en parte, por estas proteínas hipotalámicas.

En general, se acepta que la activación farmacológica de AMPK en el hígado y en el músculo puede provocar una disminución en los niveles lipídicos y de glucosa en la sangre que podría ser útil en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Long and Zierath, 2006). Los datos obtenidos en nuestro estudio sugieren que el aumento de los niveles de glucosa (similares a los encontrados en pacientes diabéticos no controlados) puede modular no sólo la actividad de AMPK, sino también su expresión, de forma específica dependiendo del tipo celular y de las diferentes áreas cerebrales.

Dado que la activación de la AMPK hipotalámica promueve la ingesta de alimentos, mientras que la disminución de su actividad enzimática está asociada a hipofagia (Kim et al., 2004a; Kohno et al., 2011; Minokoshi et al., 2004), se puede decir que la función del GLP-1 como péptido anorexigénico puede venir modulada, en parte, por su efecto inhibitorio sobre la activación de la AMPK, lo que conllevaría una reducción de la ingesta. De hecho, recientemente se ha propuesto un modelo en las células hipotalámicas GT1-7 en el que se postula que la estimulación del GLP-1R reduce la ingesta de alimentos a través de la inhibición de la fosforilación de AMPK, de una forma dependiente del metabolismo de la glucosa. En este estudio se especula con que la inhibición de la AMPK por la activación del GLP-1R ocurre por un incremento del metabolismo de la glucosa, y esto es apoyado porque, en ausencia de glucosa, la exendina-4 (análogo estructural del GLP-1 con mayor estabilidad) inhibe la activación de la AMPK hipotalámica en las células GT1-7. Esto indicaría que la glucosa no sólo es un estímulo para la secreción del GLP-1, sino que forma parte del mecanismo por el cual el GLP-1 suprime la ingesta (Burmeister et al., 2013). Además, basándose en que la secreción de insulina inducida por GLP-1 en las células β -pancreáticas depende de la disponibilidad de nutrientes, otros autores apuntan que la señalización del GLP-1 en el SNC es también dependiente de la concentración de glucosa (Sandoval et al., 2012).

Se ha corroborado que los péptidos anorexigénicos disminuyen la actividad de la AMPK α 2 (Andersson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004). Así, se ha observado que señales anorexigénicas como la leptina (Su et al., 2012) y la glucosa (Fan et al., 2009; McCrimmon et al., 2004; McCrimmon et al., 2008) inhiben la actividad de la AMPK hipotalámica. Estudios posteriores indicaron que el GLP-1 y la leptina reducen cooperativamente la ingesta de alimentos, al menos en parte, a través de la inhibición de la AMPK, la estimulación de la expresión de POMC y las acciones de α -MSH (Poleni et al., 2012). Otros autores también han documentado que la insulina y la leptina aumentan la fosforilación de la S6K1 y que el tratamiento con rapamicina, un inhibidor de mTOR, bloquea el efecto de la leptina (Cota et al., 2006). En nuestro estudio, el GLP-1 modula la actividad tanto de la AMPK como de la S6K1 en las áreas VMH y LH. Así, el GLP-1 revierte el efecto de la glucosa sobre la AMPK y S6K1. Estos resultados confirman las conclusiones obtenidas utilizando células hipotalámicas GT1-7 y células de neuroblastoma de ratón, donde se observan estos efectos contra-regulatorios del GLP-1 sobre la actividad de AMPK y

S6K1, siempre bajo tratamientos de glucosa que producían las máximas estimulaciones de estas quinasas.

Existen evidencias experimentales que sugieren que la activación prolongada de la S6K1 está involucrada en la patogénesis de la resistencia a insulina inducida por la dieta (Ono et al., 2008), así como en otras patologías asociadas a la diabetes como, por ejemplo, las nefropatías (Mori et al., 2009a). Por ello, el hecho de que el GLP-1 reduzca la actividad de la S6K1 a nivel central, junto con el efecto antidiabetogénico probado de este péptido (Gutniak et al., 1992), apoyaría la utilización del GLP-1 en personas diabéticas, puesto que podría además revertir el efecto de la resistencia a insulina en dichos pacientes.

Las vías de señalización implicadas en la modulación por GLP-1 de los sensores metabólicos hipotalámicos siguen siendo en gran medida desconocidas. Para su esclarecimiento, en este trabajo hemos utilizado inhibidores específicos de las quinasas o fosfatasas que pudieran estar implicadas en las acciones del GLP-1 sobre la actividad de los sensores de nutrientes.

Los resultados obtenidos en células N2A sugieren que la vía de señalización iniciada por el receptor de GLP-1 que regula la actividad de la AMPK puede estar mediada por la activación de las proteínas quinasas: PKA, PKC y PI3K, y que el efecto del GLP-1 podría depender también de proteínas fosfatasas como PP2. Estos resultados concuerdan con los hallazgos recientemente documentados por Hayes y cols. (Hayes et al., 2011), que establecen una relación entre el incremento de la actividad de la PKA (que inhibe a la AMPK) y de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la supresión de la ingesta de alimentos por el GLP-1 en el núcleo del tracto solitario. Además, estudios llevados a cabo en cerebro apuntan que la supresión de la ingesta de alimentos mediada por el receptor de GLP-1, requiere una disminución en la fosforilación de Akt unida a la membrana, dependiente de la activación de la PI3K (Rupprecht et al., 2013). En varios estudios se describe también que la regulación de la actividad de AMPK depende de la actividad de proteínas fosfatasas (Garcia-Haro et al., 2010; Woods et al., 2003). Otros autores establecen que las acciones anorexigénicas de otros péptidos como la insulina o la leptina pueden ser bloqueadas por la inhibición de la PI3K, que media la activación de mTOR y S6K1 (Niswender et al., 2003; Niswender et al., 2001).

Además, estudiamos el efecto de estos inhibidores sobre la activación de mTOR/S6K1 concluyendo que la activación de S6K1 en respuesta a la elevación de glucosa disminuye en presencia de los inhibidores de PI3K o de mTOR. En células β -pancreáticas se ha descrito que la fosforilación de la S6K1 inducida por glucosa se lleva a cabo por una vía independiente de la PKA, y que la activación de PKA mediada por GLP-1 modula la fosforilación de otras quinasas como ERK, sin afectar a la fosforilación de la S6K1 (Briaud et al., 2003). No obstante, nuestros resultados indican que en células neuronales el efecto inhibitorio de GLP-1 en la fosforilación de la S6K1 a alta concentración de glucosa podría estar mediado por la PKA.

Recientemente se ha publicado que, en el hipotálamo, las vías mTOR/S6K1 y AMPK convergen en una cascada de fosforilaciones integradas para mediar la acción de determinados péptidos anorexigénicos, como la leptina. Estos estudios indican que la S6K1 fosforila a la AMPK α en residuos de Ser 485/491. Esta fosforilación es necesaria para mantener la regulación de la AMPK por la leptina demostrando que estas vías formarían una red de señalización unificada en el hipotálamo para mediar el efecto anorexigénico y de regulación del peso corporal de la leptina (Dagon et al., 2012).

El GLP-1 actúa tanto a nivel del SNC como periféricamente promoviendo la secreción de insulina, manteniendo la homeostasis de la glucosa y reduciendo la ingesta y el peso corporal (Williams, 2009). El hecho de que el GLP-1 no solamente se sintetice en células intestinales, sino también en el tronco cerebral, podría indicar que este péptido actúa como mediador principal de los efectos anorexigénicos a nivel central. Estudios recientes indican que la administración intraperitoneal de GLP-1 y leptina tiene un potente efecto anorexigénico y este efecto requiere la conexión entre el cerebro posterior y el hipotálamo (Akieda-Asai et al., 2014). No obstante, hay evidencias de la existencia de acciones periféricas del GLP-1 en la regulación de la ingesta (Williams et al., 2009).

Algunos estudios indican que la administración icv de GLP-1 reduce la fosforilación de la AMPK hipotalámica en el residuo Thr 172 (Burmeister et al., 2012; Seo et al., 2008). Además, la inhibición de la AMPK por activación del receptor de GLP-1 también se observa en otras regiones no hipotalámicas, así la incorporación de exendina-4 en el cuarto ventrículo reduce la fosforilación de la AMPK en el complejo vagal dorsal del cerebro posterior suprimiendo la ingesta de

alimentos, y este efecto anorexigénico es atenuado con la administración de AICAR (activador de AMPK) (Hayes et al., 2011).

Otras investigaciones señalan que la administración icv de fructosa estimula la ingesta y la actividad de la AMPK hipotalámica (Lane and Cha, 2009). Dado que la inhibición central de AMPK es necesaria para el efecto anorexigénico de agonistas del GLP-1R, entonces la activación de la AMPK por fructosa podría atenuar el efecto anorexigénico del GLP-1. Esto explicaría la reducción de la saciedad asociada con el consumo de alimentos y bebidas ricas en fructosa y sacarosa (Burmeister et al., 2013). Cabe destacar que la pérdida de actividad de GLP-1R en ratones deficientes para este receptor (*Glp-1r^{-/-}*) está asociada tanto con un incremento de la ingesta como con un incremento de la actividad de la AMPK hipotalámica (Burmeister et al., 2013), apoyando nuestros datos.

En la obesidad, los elevados niveles de nutrientes y las modificaciones hormonales, pueden alterar la actividad de los sensores metabólicos hipotalámicos. Así, la obesidad inducida por la dieta reduce la actividad de la AMPK hipotalámica (Martin et al., 2006). La exendina-4 es uno de los agentes utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Niswender, 2010) y tiene efectos a largo plazo, produciendo pérdida de peso (Blonde et al., 2006; Buse et al., 2009; Montanya and Sesti, 2009). Con estos precedentes, un paso más allá en nuestro estudio fue analizar *in vivo*, y bajo condiciones fisiopatológicas, la respuesta de los sensores metabólicos en condiciones de ayuno y alimentación, así como el efecto de la exendina-4 en la actividad de AMPK y S6K1 en las áreas hipotalámicas VMH y LH. Las ratas Zucker (fa/fa) obesas se utilizan como un modelo animal bien establecido de resistencia a insulina y obesidad genética y, a diferencia de las ratas Zucker delgadas (Fa/fa), presentan hiperlipidemia e hiperinsulinemia.

Se ha descrito que la administración subcutánea a largo plazo de exendina-4 disminuye la ingesta de alimentos y provoca pérdida de peso en ratas Zucker obesas y controles delgadas (Rodríguez de Fonseca et al., 2000).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo de investigación, junto con estudios previos y análisis posteriores (Burmeister et al., 2013), demuestran que la inhibición de la AMPK es un mecanismo general por el cual el GLP-1 inhibe la ingesta de alimentos, es decir, la inhibición de AMPK es necesaria para que se produzca el efecto anorexigénico mediado por la activación central de GLP-1R.

La actividad de la AMPK en el VMH y LH de las ratas delgadas y obesas se incrementa durante la inanición y se inhibe a las 2 h después de haber sido re-alimentadas, confirmando lo anteriormente publicado (Kim et al., 2004b; Minokoshi et al., 2004). Sin embargo, el tiempo de ayuno previo a la re-alimentación es crucial para observar estos efectos. Por ejemplo, se precisan 48 horas de ayuno para incrementar significativamente la actividad de AMPK, mientras que cuando el ayuno tiene una duración de 24 horas no se observa un aumento de la activación de esta quinasa, tal y como se había descrito previamente utilizando otros métodos experimentales (Kim et al., 2004b; Minokoshi et al., 2004). No obstante, investigaciones llevadas a cabo con ratas machos Spragle Dawley también indicaban que son necesarias 48 horas de ayuno para incrementar significativamente la actividad de la AMPK en el núcleo del tracto solitario y en el hipotálamo (Hayes et al., 2009).

De los efectos examinados en nuestros experimentos *in vivo* destacamos que el nivel de activación de AMPK es menor en ratas Zucker obesas que en las delgadas controles en ambas áreas. Esto podría ser debido a las alteraciones en los niveles de nutrientes y hormonas que se producen en las ratas obesas (Fig. 16).

El nivel de activación de la S6K1 es similar en ratas delgadas y obesas, pero se obtuvo un resultado inesperado al analizar el efecto del ayuno y la re-alimentación sobre la actividad de la S6K1. Dicha quinasa disminuye significativamente en el VMH y LH de animales que fueron re-alimentados durante 2 horas, en comparación con los animales en ayunas. La activación de S6K1 sólo se observa después de las 4 h de re-alimentación, indicando que la duración de ésta ingesta es crucial para alcanzar la máxima actividad de S6K1. Esta dependencia del tiempo de duración de la toma de nutrientes, concordaba con los ensayos realizados en células N2A, donde se requerían periodos de 3-4 h para conseguir la activación de S6K1 y menores para lograr la de AMPK.

Cota y cols. observaron una disminución de la forma activa de S6K1 en ratas mantenidas en ayunas respecto a ratas re-alimentadas durante 3 h (Cota et al., 2006). Es posible que en nuestros experimentos no se haya podido detectar la máxima activación de la S6K1 y, por ello, no se observan diferencias significativas entre el nivel de actividad de S6K1 de animales ayunados respecto a los re-alimentados durante 4 h. Nuestros datos indican que, al menos con nuestro diseño

experimental, el nivel más bajo de actividad de S6K1 en el VMH y LH está presente en las ratas re-alimentadas durante 2 h.

Nuestros datos muestran que uno de los mecanismos fisiopatológicos que ocurren en las ratas Zucker obesas es la ausencia del efecto inhibitorio producido por el GLP-1 sobre la actividad de AMPK en respuesta al ayuno. Es decir, el ayuno estimula la actividad de la AMPK hipotalámica en ratas Zucker delgadas y la administración subcutánea de exendina-4 bloquea dicho efecto, pero este bloqueo por exendina-4 no ocurre en ratas Zucker obesas. Este efecto puede ser debido a la falta de estimulación de la AMPK en condiciones de ayuno. Puesto que la exendina-4 sólo regula la actividad de la AMPK cuando el grado de activación/inhibición es máximo, en este caso carecería de efecto (Fig. 16).

Por otro lado, observamos que la exendina-4 activa la AMPK cuando el nivel de fosforilación es mínimo y se encuentra inactiva, como ocurre en los animales re-alimentados durante 2 h. En consecuencia, el GLP-1 podría actuar como un compensador para las variaciones en la actividad de la AMPK producidas ya sea por oscilaciones en los niveles de glucosa o por patologías tales como la obesidad o episodios de hiperinsulinemia. Es más, estudios posteriores apoyan nuestros resultados, puesto que se propone que la inhibición de la AMPK sería un mecanismo general por el cual el GLP-1 inhibe la ingesta de alimentos, y que la inhibición de este sensor sería necesaria para que se produzca el efecto anorexigénico mediado por la activación central del GLP-1R (Burmeister et al., 2013).

El GLP-1 participa en la compleja regulación de la actividad de los sensores hipotalámicos bajo diferentes condiciones nutricionales, al igual que lo hacen algunas otras hormonas, cuyas acciones se ven condicionadas por el ayuno o la ingesta e incluso por la región hipotalámica sobre la que actúa. Por ejemplo, se ha descrito que la grelina o los cannabinoides presentan efectos *ad libitum* (McCrimmon et al., 2006), mientras que la leptina (Minokoshi et al., 2004) y la adiponectina (Kubota et al., 2007) sólo tienen un efecto después de tiempos variables de ayuno o de re-alimentación. Así mismo, se ha observado que la administración icv de los transcritos regulados por cocaína y anfetaminas (CART) produce efectos anorexigénicos (Kristensen et al., 1998), mientras que inyectados directamente en el núcleo paraventricular o arqueado de ratas ayunadas provocan un incremento en la ingesta de alimentos (Abbott et al., 2001).

Existen evidencias documentadas en las que se pone de manifiesto que los péptidos anorexigénicos (tales como la insulina y la leptina) estimulan la vía mTOR/S6K1 y ello conduce a la inhibición de la ingesta de alimentos (Cota et al., 2006). Nuestros resultados indican que la exendina-4 modula la actividad de S6K1, pero de una forma totalmente dependiente del estado de activación de esta quinasa, tal como ocurría con la AMPK. La exendina-4 estimula la actividad de la S6K1 en los animales re-alimentados durante 2 h (que muestran la activación más baja de la quinasa) mientras que, por el contrario, disminuye notablemente la actividad de la S6K1 cuando ésta es máxima, tal y como ocurre en el VMH de ratas delgadas re-alimentadas durante 4 h.

Como se ha mencionado con anterioridad, la activación prolongada de la S6K1 hipotalámica estaría involucrada en la patogénesis de la resistencia a la insulina hepática inducida por la dieta (Ono et al., 2008). Nuestros datos indican que en presencia de la exendina-4 la actividad de S6K1 podría estar disminuida cuando la activación de esta proteína fuera máxima. Esto sugiere que los tratamientos con exendina-4 en diabéticos podrían también mejorar la resistencia a la insulina hepática.

En resumen, los resultados presentados en esta memoria de tesis indican que el GLP-1/exendina-4 regula la actividad de la AMPK y mTOR/S6K1 en las áreas VMH y LH intentando modular los estados de actividades extremas de ambos sensores. La actividad de estas quinasas se ve modificada por variaciones fisiológicas en las concentraciones de nutrientes y/o alteraciones hormonales originadas por estados patológicos, tales como la obesidad y la resistencia a la insulina. Nuestros datos indican que el GLP-1 o la exendina-4 preservan las actividades de la AMPK y la S6K1 en algunos estados patológicos vislumbrando, además, alguna de las quinasas o fosfatasa mediadoras en esta acción (Fig. 16).

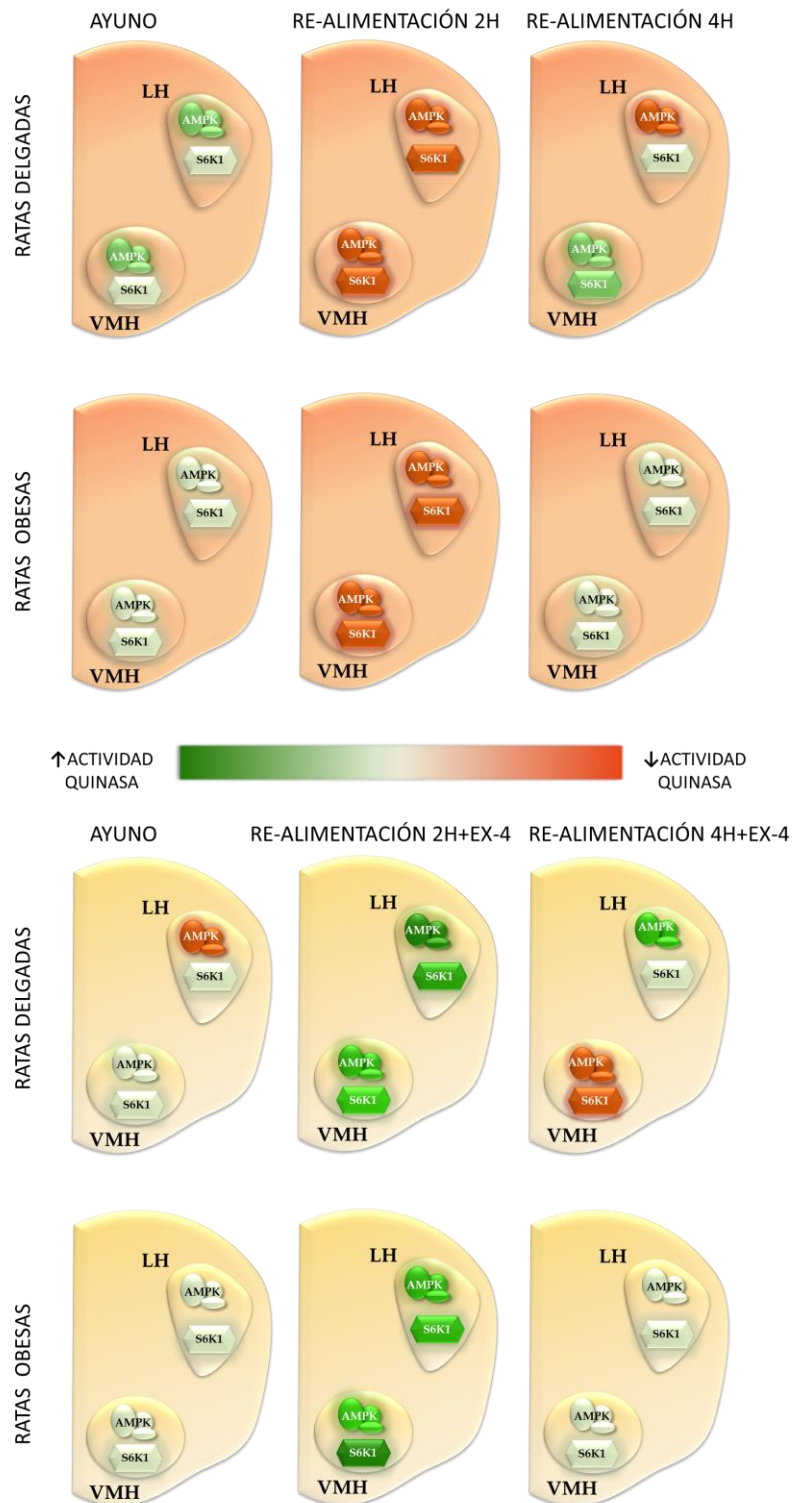


Figura 16. Figura representativa de los efectos del ayuno y la re-alimentación, así como de la administración de exendina-4 sobre la actividad de AMPK y S6K1 en ratas Zucker obesas y controles delgadas. Las ratas se ayunaron o re-alimentaron durante 2 o 4 horas y en algunos casos se administró exendina-4 (EX-4) (100 nM). Los niveles de activación/inhibición de la AMPK y la S6K1 son distintos en ratas obesas y controles, variando en función del área hipotalámica y del estado nutricional (mayor actividad representada en color verde y menor actividad en rojo), siendo además modulados por la exendina-4. Hipotálamo ventromedial (VMH) e hipotálamo lateral (LH).

Una vez descritos los efectos que los nutrientes y el GLP-1 ejercían en las vías de señalización de AMPK y mTOR/S6K1, nos propusimos estudiar el papel de otro posible sensor metabólico (cuya regulación es menos conocida) y su función en el mecanismo sensor de nutrientes, centrando nuestro estudio en las áreas hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta de alimentos. Así, estudiamos la respuesta de PASK a cambios de nutrientes en periodos de ayuno y alimentación, y su posible modulación por GLP-1 en las áreas VMH y LH. Además, analizamos la interrelación de PASK con la AMPK y la vía mTOR/S6K1.

La PASK es una proteína altamente conservada a lo largo de la evolución que vincula la síntesis de proteínas y el flujo energético en levaduras, regula la síntesis de glucógeno y la traducción de proteínas en mamíferos y está involucrada en la regulación de la secreción de insulina en páncreas.

Según determinados estudios realizados en cultivo de células β -pancreáticas de ratón, PASK actúa como un sensor de nutrientes y es rápidamente activada por alta glucosa (da Silva Xavier et al., 2004). Sin embargo, existe controversia al respecto, pues otros grupos de investigación no han encontrado evidencias de la regulación de PASK por glucosa, ni en células β -pancreáticas, ni en líneas celulares de testículo de ratones deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) o en ratones de tipo silvestre (Borter et al., 2007).

Lo que sí está claro, independientemente de su potencial papel como sensor de nutrientes, es que los ratones *Pask*^{-/-} son resistentes a la obesidad inducida por dieta rica en grasa debido a una mejorada tolerancia a la glucosa, a un aumento de la sensibilidad a la insulina y a una menor acumulación de triglicéridos hepáticos (Hao et al., 2007). Así, los ratones *Pask*^{-/-} presentan un fenotipo metabólico similar al descrito en los ratones deficientes en S6K1 (Pende et al., 2000; Um et al., 2004), ya que en ambos casos los ratones se encuentran protegidos frente a la obesidad inducida por dietas ricas en grasa.

Asimismo, se ha propuesto que la PASK puede regular el metabolismo de hidratos de carbono y proteínas, además de la expresión de la insulina. La PASK fosforila e inhibe diferentes sustratos relacionados con el metabolismo de la glucosa, como la GS y la GSK3 β (Semache et al., 2013; Wilson et al., 2005), pero también fosforila otras proteínas relacionados con la traducción proteica como S6 y eEF1- α 1 (Eckhardt et al., 2007). Un aumento de la actividad de PASK en células β -

pancreáticas podría promover la inducción transcripcional del PDX-1, lo que conduciría a la expresión del gen de la pre-proinsulina (An et al., 2006; da Silva Xavier et al., 2004).

Investigaciones recientes sugieren que la PASK actúa como un integrador de señales que ajusta el comportamiento metabólico en respuesta a condiciones nutricionales y que, al igual que otras quinasas como AMPK y mTOR, podría ser considerada una diana terapéutica frente a diabetes, obesidad y cáncer.

En el presente estudio, mediante técnicas de hibridación *in situ* o tinción con X-gal, hemos identificado PASK en regiones hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta lo que sugiere que esta quinasas, al igual que otros sensores metabólicos (AMPK y mTOR), podría desempeñar alguna función en el control de la ingesta y estar regulada tanto por nutrientes como por péptidos anorexigénicos/orexigénicos.

La respuesta de la expresión de *Pask* a glucosa y péptidos intestinales fue observada en las áreas hipotalámicas VMH y LH de rodajas hipotalámicas de rata en cultivo. Nuestros resultados muestran que el aumento de la concentración de glucosa y el tratamiento con GLP-1 provocan una disminución en la expresión del ARNm de PASK en las áreas hipotalámicas VMH y LH. Sin embargo, el efecto del GLP-1 a alta concentración de glucosa es diferente en ambas áreas, ya que el tratamiento con dicho péptido invierte el efecto de la alta glucosa específicamente en LH, pero no en VMH. Las diferencias en la respuesta pueden ser debidas a la función diferencial de estas áreas y/o a la distribución de las poblaciones neuronales como las células GE o GI en estas regiones.

Estudios previos indican que existe un patrón distinto de la regulación del mensajero que codifica para el GLP-1R en respuesta a la glucosa y a neuropéptidos en las áreas VMH y LH (Sanz et al., 2008). Las diferencias de la expresión génica del GLP-1R en estas áreas podrían explicar nuestros resultados, puesto que se encuentra una mayor expresión del GLP-1R en el área LH respecto al VMH (Sanz et al., 2008). Además, hemos comprobado que la expresión de PASK también varía en diferentes áreas hipotalámicas, así en el LH la expresión era aproximadamente un 40% menor que en el VMH. Estos datos podrían sugerir la existencia de una expresión de PASK variable entre diferentes poblaciones neuronales.

Los datos obtenidos en nuestra investigación indican que el gen *Pask* está regulado por glucosa y GLP-1 (péptido anorexigénico cuyo nivel aumenta después de la ingesta de alimentos), informando al SNC del estado de los nutrientes e indicando que PASK puede estar implicada en el control de la conducta alimentaria.

Para analizar el posible efecto de los nutrientes en la actividad de PASK se intentó valorar la fosforilación de esta quinasa, sin embargo, fue inviable detectar la activación directa de la PASK, pues hasta la fecha no se ha encontrado ningún anticuerpo específico que nos permita identificar las formas activas de PASK. Nos propusimos, por lo tanto, inmunoprecipitar la proteína para medir la actividad quinasa *in vitro*, pero el resultado no fue satisfactorio.

Teniendo en cuenta todo esto, para obtener más información acerca de la función de la PASK, en primer lugar, buscamos una línea celular neuronal que respondiera a glucosa y que nos permitiera en su caso interferir la expresión de dicha quinasa y analizar los efectos de su deficiencia. En este estudio, comprobamos que la proteína PASK se expresa y se comporta como un sensor de nutrientes en células de neuroblastoma. Nuestros datos indican que la expresión del gen *Pask* se incrementa a baja concentración de glucosa en estas células, y que este efecto es revertido en presencia de GLP-1. Las alteraciones observadas en el ARNm de la PASK se confirmaron a nivel proteico. Así, en las células N2A expuestas a alta concentración de glucosa o a GLP-1 durante más de 8 horas se observa una disminución significativa de la cantidad de proteína PASK.

Posteriormente, para esclarecer el posible papel de la PASK en el mecanismo sensor de glucosa, comparamos las respuestas de otros sensores metabólicos a cambios de glucosa en células de neuroblastoma control y células transfectadas con ARN de interferencia de *Pask*.

Como citamos previamente los sensores metabólicos (AMPK, mTOR/S6K1) tienen un papel determinante para regular de forma coordinada el metabolismo celular en función del aporte de nutrientes. Nuestros datos indican que la disminución de más de un 75% en la expresión del ARNm de *Pask* es suficiente para alterar la respuesta a glucosa de las vías de señalización de AMPK y mTOR/S6K1 en células de neuroblastoma. No obstante, el efecto mediado por PASK en estas vías es principalmente a nivel postranscripcional, puesto que las

células N2A silenciadas para la PASK no muestran una modificación significativa en la expresión de los genes que codifican para mTOR y S6K1. No obstante, si se percibe una disminución de los niveles del gen que codifica para LKB1 y eIF-4B en células silenciadas para PASK. Además, observamos que el tratamiento con alta concentración de glucosa produce una disminución significativa en la expresión de LKB1, y que el GLP-1 revierte dicho efecto.

Por desgracia, no conseguimos medir la expresión del ARNm que codifica para la AMPK α 2 en células N2A, ni siquiera utilizando dos sondas diferentes. Esto sugiere la presencia de mutaciones puntuales que impedirían el reconocimiento de las sondas. Sin embargo, la AMPK α 2 se cuantificó por inmunodetección, y se comprobó que la expresión de esta proteína no está modificada en células silenciadas para la PASK. Por otra parte, los niveles elevados de glucosa producen una disminución de la cantidad de proteína total, específicamente en células control. Estos resultados confirman el efecto regulador de la glucosa en la expresión de la AMPK que hemos descrito previamente en esta tesis y con anterioridad por otros autores (McCrimmon et al., 2006; Seo et al., 2008). También demuestran que el efecto de glucosa se anula tras el silenciamiento de PASK en estas células.

La AMPK es capaz de controlar la disponibilidad de energía detectando la tasa de AMP/ATP celular. Los estados de baja energía, caracterizados por la disminución de ATP, activan esta quinasa, que promueve las vías catabólicas e inhibe las anabólicas para recuperar el equilibrio energético. Las células silenciadas en PASK pierden su capacidad para responder al descenso de la concentración de glucosa, ya que la AMPK no se activa en estas condiciones.

Para identificar las causas de la falta de activación de la AMPK a baja concentración de glucosa en las células deficientes en PASK, analizamos los niveles de ATP y la expresión de las quinasas que fosforilan y activan la AMPK.

La activación de la AMPK se correlaciona con el aumento del ratio AMP/ATP. Los niveles de ATP afectan a la estimulación de la AMPK en las neuronas y a la regulación de los neuropéptidos que modulan el comportamiento alimentario (Lee et al., 2005). Nuestros datos indican que los niveles elevados de glucosa y ATP en las células N2A se corresponden con una menor activación de AMPK, mientras que los niveles más bajos de ATP se asocian con una mayor

activación de AMPK. Por el contrario, la presencia de bajos niveles de glucosa en las células silenciadas para PASK se correlaciona con mayor concentración de ATP y la ausencia de la activación de AMPK. Resultados similares fueron descritos en líneas celulares de mioblastos L6 deficientes para PASK (Hao et al., 2007), aunque no se han encontrado diferencias en la producción de ATP celular en fibroblastos procedentes de ratones *Pask*^{-/-} (Schlafli et al., 2009).

La activación de la AMPK también está regulada por varias quinasas. En mamíferos, las dos quinasas principales son LKB1 y CaMKK β (Hardie et al., 2012; Viollet et al., 2009). Por ello, la baja expresión del ARNm que codifica para LKB1 a baja concentración de glucosa en las células silenciadas en PASK, también explica la falta de activación de AMPK en estas condiciones. Datos similares se encontraron también en músculo (Sakamoto et al., 2005) o en hígado deficiente en LKB1 (Shaw et al., 2005).

Como se ha mencionado con anterioridad, la expresión de *Lkb1* está regulada por glucosa y GLP-1 en células de neuroblastoma. En condiciones de baja concentración de glucosa se produce un incremento del ARNm que codifica para LKB1 y el GLP-1 revierte dicho efecto, pero esta regulación no se observa en células silenciadas en PASK, que mantienen niveles bajos del ARNm de LKB1. La regulación por glucosa y GLP-1 contradice publicaciones previas que apuntan a una activación constitutiva de LKB1 (Sanders et al., 2007), por lo que se requieren estudios adicionales para aclarar si este hallazgo es característico de esta línea celular.

En nuestros resultados, se detecta también un ligero descenso en la expresión de la proteína CaMKK β en células silenciadas en PASK con respecto a las células control. Por otra parte, la presencia de un inhibidor de CaMKK no altera la activación de la AMPK por niveles bajos de glucosa en las células N2A. Todos estos datos podrían explicar la falta de activación de AMPK en las células deficientes en PASK, teniendo en cuenta el incremento en la concentración de ATP y la menor expresión de LKB1 y CaMKK β .

En condiciones de carencia energética la AMPK actúa como uno de los reguladores principales de la biogénesis mitocondrial, y lo hace regulando diversas proteínas transcripcionales, como PGC1 α (co-activador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ). Este coactivador transcripcional puede

coordinar la biogénesis mitocondrial, la fosforilación oxidativa y modular un número de genes involucrados en vías metabólicas como la gluconeogénesis, la síntesis y oxidación de ácidos grasos o la glucólisis. Se ha demostrado que es necesaria la activación del PGC1 α para que se produzca la activación mitocondrial mediada por AMPK (Rohas et al., 2007). El incremento en la concentración de ATP en células silenciadas en PASK a bajas concentraciones de glucosa podría explicarse por un aumento de la expresión de PGC1 α . Sin embargo, nuestros resultados indican que la expresión de este co-activador no se altera en células silenciadas en PASK y tampoco se observan efectos ni de la glucosa ni del GLP-1.

Las acciones de la AMPK en la regulación de la ingesta pueden estar mediadas por la ACC. La AMPK fosforila e inhibe la ACC, cuya activación impide la entrada y oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria. La activación de la AMPK hipotalámica inducida por el hambre provoca la inactivación de la ACC, la disminución del malonil-CoA y, por consiguiente, la estimulación de la oxidación de los ácidos grasos. Así, por ejemplo, se ha descrito que la grelina (péptido orexigénico) estimula la AMPK y otras vías de señalización promoviendo la inhibición de la lipogénesis y el aumento de la oxidación de los ácidos grasos, lo que conduciría a cambios en el metabolismo mitocondrial, mejorando la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación de neuronas NPY/AgRP (Andersson et al., 2004; Andrews et al., 2008; Kola et al., 2005; Varela et al., 2011).

Nuestros datos confirman que la activación de la AMPK se correlaciona con la fosforilación (inactivación) de la proteína ACC, aunque se observan algunas diferencias en el nivel de activación de ambas proteínas. El grado de activación de AMPK en las células silenciadas en PASK no se modifica significativamente por cambios en la concentración de glucosa y es similar al de las células control tratadas con alta glucosa. No obstante, en células silenciadas los niveles de fosfo-ACC disminuyen al descender la glucosa pero no de forma drástica, mientras que al elevar la glucosa la fosforilación es muy baja en las células controles y silenciadas en PASK.

Las diferencias en los niveles de fosforilación de AMPK y ACC observadas a distintas concentraciones de glucosa podrían ser causadas por alteraciones en la ubicación de ambas proteínas. La ACC se encuentra exclusivamente en el citoplasma y su fosforilación depende de la presencia de la AMPK. Sin embargo, la

AMPK α 2 puede desplazarse entre el núcleo y el citoplasma de acuerdo con estudios previos que indican que niveles bajos de energía y un aumento del estrés oxidativo concentran a la AMPK en el núcleo celular (Kodiha et al., 2007). No podemos descartar que la deficiencia de PASK pueda alterar la ubicación de la AMPK α 2.

La ausencia de activación de la AMPK a baja concentración de glucosa en las células deficientes en PASK está acompañada de sobre-estimulación de la vía mTOR/S6K1, mientras que, por el contrario, la abundancia de nutrientes estimularía esta vía en las células control (Fig. 17).

La ruta de señalización de la PI3K/Akt/mTOR/S6K1 es crucial en la célula, puesto que regula la señalización de múltiples procesos biológicos tales como la apoptosis, el metabolismo, la proliferación y el crecimiento celular. Esta vía es estimulada fisiológicamente por factores de crecimiento, hormonas, etc. y su activación anormal resulta en alteraciones de los mecanismos de control del crecimiento y de la supervivencia celular. La transducción de señales dependería a su vez de la fosfatasa PTEN, que es uno de los principales reguladores negativos de esta vía. Uno de los últimos miembros de la vía, la S6K1, ejerce un efecto de regulación negativa sobre la misma mediante la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (Khamzina et al., 2005).

Además, la activación de mTOR podría depender también de la vía de las MAPKs. Experimentos descritos previamente en células N2A indican que el efecto de la alta glucosa en la activación de la S6K1 se produce a través de PI3K y mTOR, y no de las MAPKs. Por ello, para profundizar en el mecanismo mediante el cual la deficiencia de PASK afecta a esta vía, analizamos el nivel de activación de Akt y la expresión de la proteína PTEN en células silenciadas para la PASK, en condiciones de alta y baja concentración de glucosa.

Nuestros datos muestran que las células N2A control expuestas a niveles bajos de glucosa registran activación de AMPK e inactivación de S6K1, tal y como cabría esperar, pero es sorprendente observar que la Akt se encuentra fuertemente activada a pesar de las condiciones de depleción energética. Estos datos están de acuerdo con estudios que relacionan la activación continuada de la AMPK con la inducción de apoptosis en muchos tipos celulares y, en este caso, la activación de la vía Akt podría prevenir la muerte celular (Cai et al., 2008). Estudios realizados en

miocitos indican, asimismo, que los niveles bajos de glucosa aumentan la actividad de Akt y GSK3 β mediada por la activación de AMPK (Chopra et al., 2012), lo que podría apoyar nuestros resultados.

Por otro lado, se ha descrito que la inhibición de la de la vía Akt/mTOR mediada por S6K1 no se lleva a cabo en estados deficitarios de glucosa y en estas condiciones mTORC2 se encuentra fuertemente activado. De esta forma, la vía proporciona señales de supervivencia celular (Chopra et al., 2012). La AMPK, a su vez, puede inhibir mTORC1 fosforilando a TSC2, lo que en conjunto refleja la complejidad de la retro-regulación entre las vías de AMPK y Akt/mTOR.

En cuanto al tratamiento con GLP-1, los resultados obtenidos señalan que el tratamiento con este péptido disminuye la actividad tanto de la AMPK como de Akt a bajas concentraciones de glucosa. Bajo estas condiciones, es interesante resaltar que se produce una disminución de la actividad de AMPK en células silenciadas en PASK, lo que podría explicar la plena activación de S6K1, es decir, se confirma el efecto contra-regulatorio de la AMPK en la vía mTOR/S6K1. Por otro lado, Akt se mantiene activa en ausencia de tratamiento con GLP-1, aunque el nivel de activación es significativamente menor que en las células control. La capacidad de AMPK de inhibir la vía mTOR/S6K1 fue comprobada en presencia de AICAR (que actúa como estimulador alostérico de AMPK). Comprobamos que, tanto en células deficientes en PASK como en las células control, la estimulación de la AMPK en presencia de AICAR disminuye la actividad de S6K1, indicando que esta contra-regulación AMPK-S6K1 es aún posible en células con PASK silenciada.

Además, se comprobó que las alteraciones de la vía mTOR/S6K1 no se correlacionan con modificaciones de la expresión del regulador negativo de esta vía, la fosfatasa PTEN.

Nuestros resultados muestran que aunque la activación de Akt es menor después del silenciamiento de PASK, esta activación es aun significativamente más alta que a niveles elevados de glucosa, lo que sugiere que las vías de supervivencia podrían ser todavía funcionales y que otras proteínas de señalización, además de la AMPK, podrían regular este proceso en células de neuroblastoma.

Sin embargo, los datos obtenidos en nuestro estudio contradicen datos previos que indican que la función de PASK es independiente de la activación/inhibición de otros sensores metabólicos (Hao et al., 2007). Esta

controversia puede ser analizada en base a dos posibles explicaciones. En primer lugar las diferencias podrían deberse al método experimental utilizado ya que, en nuestro caso, analizamos la respuesta de los sensores metabólicos a alta y baja concentración de glucosa, es decir, cuando la actividad de la AMPK y mTOR/S6K1 alcanza los valores máximos y mínimos respectivamente. En segundo lugar esta respuesta podría ser específica de célula o de tejido.

El silenciamiento de PASK en estas células afecta no sólo a la respuesta de AMPK y la vía mTOR/S6K1 a baja y alta concentración de glucosa, sino también algunos de los efectos reguladores del GLP-1 observados tanto a nivel de la expresión génica como de la actividad de AMPK y de S6K1.

En definitiva, las células N2A deficientes en PASK no detectarían de forma óptima la disponibilidad de nutrientes. Esta quinasa en condiciones normales es regulada de una forma muy precisa, y cuando ocurre un déficit de glucosa en el medio extracelular de las células de neuroblastoma se produciría una respuesta coordinada con otros sensores metabólicos. A luz de los resultados obtenidos, en un grado mayor de complejidad, nuestros datos sugieren que PASK podría desempeñar también un papel importante en la regulación de la ingesta de alimentos, dado que actúa regulando el mecanismo sensor de glucosa, al menos en estas células.

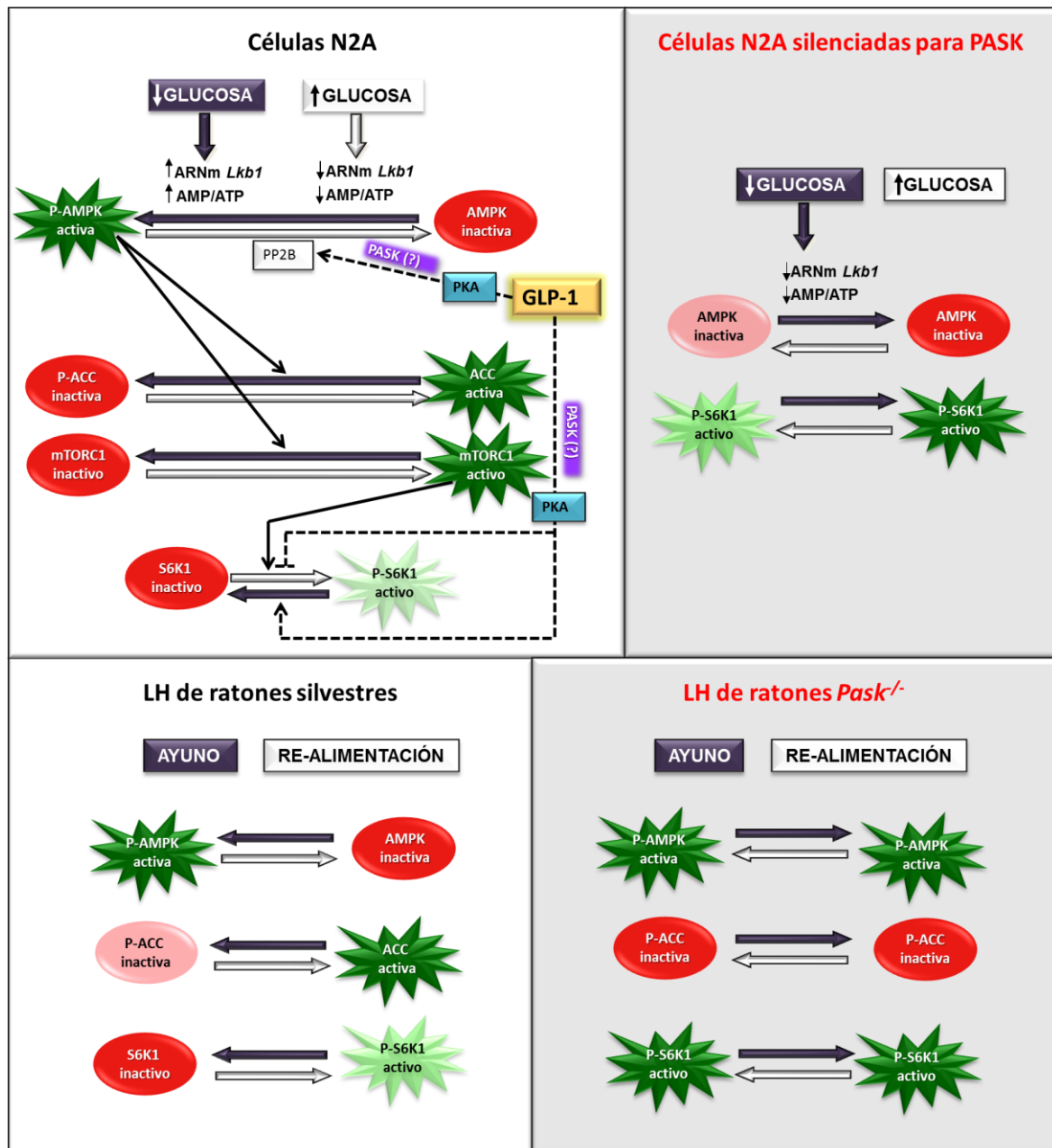


Figura 17. Esquema representativo de los efectos que ejercen la glucosa/estado nutricional y el GLP-1 sobre la actividad de la AMPK y S6K1 en células N2A controles y silenciadas para PASK, así como en el LH de ratones silvestres y deficientes en PASK (mayor actividad de las proteínas representada en color verde y menor actividad en rojo).

Como ya mencionamos, los ratones deficientes en PASK son resistentes a la obesidad inducida por la dieta rica en grasa. Los responsables de este hallazgo indican que esta resistencia sería debida a un aumento de la tasa metabólica en el músculo esquelético y que, sin embargo, no existiría alteración alguna en la función de otros sensores metabólicos como AMPK y mTOR (Hao et al., 2007).

Sin embargo, la expresión de *Pask* no sólo está restringida a los tejidos periféricos como el músculo y, por tanto, su funcionalidad puede ser mucho más amplia. Aunque está descrito que el nivel de expresión de PASK en la mayoría de los tejidos de ratón, incluido el cerebro, es baja (Katschinski et al., 2003), nuestros resultados indican que se expresa en el sistema nervioso central y, específicamente, en aquellas áreas hipotalámicas involucradas en el control de la ingesta de alimentos. En este sentido, por tinción con X-gal, observamos que la PASK se encuentra expresada en varios núcleos hipotalámicos como: VMH, PVN, ARC, y en menor medida en el LH. Además, mediante PCR a tiempo real, hemos podido constatar que los niveles de expresión de PASK varían en función del área hipotalámica. La expresión de esta quinasa es mayor en el VMH que en LH de ratones C57Bl/6.

Los estados nutricionales (ayuno y re-alimentación) controlan la expresión de PASK en las áreas hipotalámicas estudiadas. Así, los niveles de ARNm de *Pask* en el LH se incrementaron después de la re-alimentación en los ratones silvestres. Sin embargo, los ratones modificados genéticamente, los cuales portan una forma truncada no funcional de PASK, presentan una elevada expresión de ARNm de *Pask* tanto en el VMH como en LH y una falta de regulación por el estado nutricional.

Además de por nutrientes, el gen *Pask* está regulado también por el péptido anorexigénico GLP-1. Como se ha comentado con anterioridad, una alta concentración de glucosa disminuye la expresión del ARNm que codifica para la PASK en VMH y LH en cultivos organotípicos de rodajas hipotalámicas de ratas. Sin embargo, el tratamiento con GLP-1 inhibe la expresión de este gen en todas las condiciones, excepto en el LH a elevada concentración de glucosa.

No siempre los resultados obtenidos *in vitro* son extrapolables a los alcanzados *in vivo*, ya que hay que tener en cuenta que en los experimentos llevados a cabo en líneas celulares los efectos de la glucosa y del GLP-1 pueden ser analizados de forma independiente. Sin embargo, *in vivo* en condiciones de re-alimentación, el efecto observado puede ser una acción combinada de la concentración elevada de nutrientes y de la consiguiente liberación intestinal de GLP-1 tras la ingesta (incluso aunque no se haya inyectado el péptido al ratón), así como del efecto de otros péptidos reguladores.

Los sensores metabólicos hipotalámicos están directamente relacionados con el comportamiento alimentario, el peso corporal y la homeostasis energética. Un hallazgo interesante es que la deficiencia de PASK altera el mecanismo sensor de nutrientes en áreas hipotalámicas involucradas en la regulación de la ingesta y el comportamiento alimentario. Nuestros datos señalan que en el área LH de animales silvestres, y bajo condiciones de re-alimentación, la AMPK se encuentra inactiva, mientras que el nivel de fosforilación de S6K1 se incrementa significativamente en comparación con el ayuno. Se observan datos similares en VMH, aunque las diferencias no son significativas. Estos datos concuerdan con los resultados descritos anteriormente en roedores (Cota et al., 2008; Minokoshi et al., 2004). Los efectos del estado nutricional y de la exendina-4 en la fosforilación de AMPK y ACC son muy similares, como es lógico, pues ACC es sustrato directo de la AMPK.

La exendina-4 modula la actividad de AMPK y S6K1 en animales ayunados o re-alimentados. Así, en ratones re-alimentados, la exendina-4 disminuye los niveles circulantes de glucosa y la actividad de S6K1 si bien la actividad de la AMPK se mantiene baja, a pesar de que el tratamiento con exendina-4 disminuye los niveles de glucosa en sangre. Esto podría ser consecuencia más del efecto de este péptido sobre la actividad de los sensores que de la bajada de la concentración de glucosa en sangre por su acción incretina.

Aunque existen estudios que indican que no hay relación entre la deficiencia de PASK y la actividad de otros sensores metabólicos en hígado o músculo (Hao et al., 2007), nuestros resultados rebaten estas observaciones, puesto que la deficiencia de PASK altera la respuesta de la AMPK y S6K1 al estado nutricional y también al tratamiento con exendina-4 en las áreas hipotalámicas de interés. De esta manera, la AMPK y la S6K1 muestran un estado de activación más elevado en condiciones de ayuno y re-alimentación respectivamente, tanto en el LH como en el VMH. Además, el efecto regulatorio de la exendina-4 sobre ambas quinasas se pierde en ratones *Pask*^{-/-}. Por otro lado, se observa que la mayor activación de la AMPK concuerda con un incremento de la fosforilación de ACC.

Las discrepancias de estos resultados con los estudios previos, que indicaban que no existía una relación entre la deficiencia de PASK y la actividad de otros sensores metabólicos, quizás sean debidas a una respuesta específica de tejido, dado que aquellos estudios fueron realizados en hígado o músculo (Hao et

al., 2007). Con objeto de comprobar que los efectos de la PASK sobre estos sensores metabólicos no son exclusivos del SNC, sino que también se pueden observar en tejidos periféricos, se estudió la respuesta de la AMPK y mTOR/S6K1 a estados nutricionales y a exendina-4 en hígado de ratones silvestres y deficientes en PASK. En este caso, la activación de la AMPK es similar en hígado de animales ayunados de tipo silvestre respecto a los *Pask*^{-/-}, de acuerdo con los datos obtenidos por Hao y cols. (Hao et al., 2007). Sin embargo, la re-alimentación aumenta la actividad de AMPK en ratones *Pask*^{-/-}, a pesar de que en estas condiciones se observa también la sobre-activación de la S6K1.

Diversos resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* enunciados en este trabajo, apuntan a que PASK es un mediador en las acciones del GLP-1. Un ejemplo de ello es que el efecto regulador de la exendina-4 sobre los sensores metabólicos estudiados se pierde en ratones con deficiencia de PASK, confirmando los efectos ya observados en las células de neuroblastoma silenciadas en PASK. Otro ejemplo de la mediación de PASK en las acciones del GLP-1 (o de su análogo, exendina-4 en este caso) es que los ratones *Pask*^{-/-} presentan menor respuesta a la acción anorexigénica e incretina sobre la ingesta de alimentos y secreción de insulina respectivamente. La exendina-4 produce un descenso rápido de glucosa en sangre debido a su acción incretina sobre la liberación de insulina tras la ingesta de alimentos. Sin embargo, los ratones deficientes en PASK que fueron re-alimentados y tratados con exendina-4 presentan unos niveles de glucosa más altos que los ratones control. Hemos corroborado que los ratones deficientes en PASK ingieren mayor cantidad de alimento y registran una mayor concentración de glucosa en sangre y niveles similares de insulina respecto a los ratones silvestres después de la administración de exendina-4 durante la última hora de re-alimentación. Esto indica que PASK es necesaria para las acciones anorexigénicas del GLP-1. Sin embargo, los niveles circulantes de glucosa e insulina en ausencia de exendina-4 no se alteran significativamente en los ratones *Pask*^{-/-} (ayunados o alimentados) respecto a los controles, lo que confirma los resultados del test de tolerancia a la glucosa realizado por Hao y cols. (Hao et al., 2007).

Nuestros datos sugieren que algunos efectos iniciados por la exendina-4 a través de las vías AMPK y mTOR/S6K1 estarían alterados en los ratones deficientes en PASK, mientras que otros efectos de este péptido, que podrían estar

mediados por otras vías de señalización hipotalámicas o de forma indirecta, siguen activos en estos ratones.

La desregulación en la actividad de mTOR se ha relacionado con alteraciones en el comportamiento alimentario, sin embargo, existe gran controversia en la literatura sobre si la activación de mTOR en el hipotálamo conlleva comportamientos anoréxicos o al contrario. Así, la activación de mTOR se ha relacionado con la anorexia (Cota et al., 2008; Cota et al., 2006; Reed et al., 2010; Villanueva et al., 2009). Sin embargo, otros autores han mostrado que ratones deficientes en TSC1 (que promueve la activación constitutiva de mTOR en el hipotálamo y en las neuronas POMC) desarrollan una respuesta orexigénica (Mori et al., 2009b). También se ha indicado que el efecto orexigénico de la grelina está mediado por la activación de la vía mTOR hipotalámica (Martins et al., 2012), a pesar de que la grelina también activa la AMPK y estimula la ingesta de alimentos (Andersson et al., 2004; Kola et al., 2005).

En nuestro caso, los ratones deficientes en PASK muestran una mayor actividad de S6K1 y, por tanto, de mTOR, presentando una pérdida de conducta anorexigénica en respuesta a exendina-4. Además, la mayor activación de mTOR/S6K1 va acompañada sorprendentemente por una elevada activación de AMPK. Estudios previos indican que la activación de AMPK induce la inhibición de mTOR, pero en nuestro caso es sorprendente observar que en ratones deficientes en PASK no se produce la contra-regulación de AMPK y la vía mTOR/S6K1, es decir, ambas proteínas se encuentran activas en el área LH. Esta controversia puede ser explicada, al menos en parte, por la implicación en la regulación de estos sensores de otra proteína quinasa, la GSK3 β . La regulación de la vía mTOR por AMPK a nivel de TSC2 requiere la fosforilación secuencial de este complejo por AMPK y GSK3 β . De esta forma, cuando la GSK3 β se encuentra inactiva (fosforilada) la inhibición de la vía mTOR/S6K1 mediada por la AMPK se reduce significativamente (Inoki et al., 2006). Nos propusimos analizar si existía una concordancia entre el nivel de fosforilación de la GSK3 β y la mayor activación de S6K1 en los ratones deficientes en PASK. Para ello comprobamos el nivel de fosfo-GSK3 β Ser9 en el hígado y áreas hipotalámicas de los ratones silvestres y *Pask*^{-/-}, y nuestros datos preliminares confirmaron que la actividad GSK3 β está inhibida, al menos, en ratones re-alimentados *Pask*^{-/-} en comparación con los

ratones de tipo silvestre, lo que podría explicar en este caso la hiperactivación de S6K1 en estos ratones.

En cualquier caso, todos los datos previos apuntan a la existencia de una interrelación entre las vías de AMPK y S6K1, es decir, la activación de AMPK induciría la inhibición de la actividad de mTOR y la activación de S6K1 inhibiría a la AMPK α 2 en el hipotálamo (Dagon et al., 2012). Nuestros datos sugieren que la PASK podría, de alguna forma, facilitar la interconexión de ambas vías. Así, en ratones *Pask*^{-/-} tanto la AMPK como mTOR se activan simultáneamente en las áreas que participan en el control de la ingesta de alimentos, lo que sugiere que la función de PASK podría ser crítica para mantener el correcto funcionamiento de los mecanismos sensores de nutrientes y el papel regulador de exendina-4 en las regiones hipotalámicas implicadas en el control de la ingesta de alimentos.

La importancia de PASK y su relación con enfermedades tales como la obesidad y la diabetes tipo 2 puede ser una consecuencia directa de la desregulación de PASK o bien ser el resultado de su incapacidad para regular la respuesta correcta de AMPK y mTOR/S6K1 a los cambios de nutrientes y, por tanto, las respuestas alteradas de estas vías podrían llevar a las patologías antes mencionadas (Martin et al., 2006). De hecho, se ha descrito una mutación en el gen de PASK asociada directamente a la aparición de diabetes temprana ó diabetes tipo MODY (Semplici et al., 2011). Además, los pacientes con diabetes tipo 2 presentan una expresión de PASK disminuida en sus islotes pancreáticos (da Silva Xavier et al., 2011). Estos datos parecen ser contradictorios con la resistencia al desarrollo de obesidad previamente descrito en ratones deficientes en PASK, donde se vio una protección frente a la resistencia a la insulina, hecho que generalmente se produce en los animales con obesidad resultado de la ingestión de una dieta alta en grasa (Hao et al., 2007). Es posible que en los ratones deficientes en PASK muestren efectos compensatorios que originen ese fenotipo.

Dado que se han observado diversas alteraciones metabólicas asociadas a mutaciones en AMPK y mTOR/S6K1 se podría postular, así mismo, la asociación indirecta de PASK con algunas patologías debido a las alteraciones que la deficiencia en PASK ejerce sobre la actividad de estos sensores. Así, deleciones o deficiencias en las proteínas AMPK α 2 o β 1 en distintas poblaciones neuronales hipotalámicas, así como alteraciones en sus actividades, conducen a cambios importantes en el peso corporal, el gasto energético y, por tanto, promueven la

obesidad o resistencia a ésta según el caso (Claret et al., 2007; Dzamko et al., 2010; Xue et al., 2009).

Además, las alteraciones en la S6K1 resultan también en patologías similares. Así, por ejemplo, los ratones deficientes en S6K1 (*S6k1^{-/-}*), al igual que los *Pask^{-/-}*, son resistentes a la obesidad inducida por una dieta rica en grasa (Um et al., 2004).

La complejidad de la regulación y función de las vías de señalización de AMPK y mTOR/S6K1 es notable, ya que incluso probablemente sea única en cada tipo neuronal. Así, la leptina actúa a nivel hipotalámico inhibiendo la ingesta a través de mTOR/S6K1, pero la estimulación de esta vía por leptina en neuronas POMC produce un incremento de la ingesta y del peso corporal (Magnuson et al., 2012).

Todas estas evidencias indican que la alteración de la expresión o activación de estos sensores tan claves en el control del gasto energético puede generar patologías asociadas, relacionadas con modificaciones del metabolismo energético (obesidad, diabetes, etc). Dado que nuestros resultados revelan que la PASK hipotalámica resulta ser imprescindible para una actividad normalizada de estos sensores, esta quinasa sería una protagonista clave en el control de la fisiología del metabolismo y de la homeostasis energética.

Sorprendentemente nuestros datos muestran que las vías mTOR/S6K1 y AMPK se hayan hiperactivas de forma simultánea, sin embargo no se observan alteraciones en el control de la ingesta. Esto podría ser la consecuencia de un mecanismo de compensación entre ambas vías.

Los datos observados *in vivo* confirman algunas de las observaciones realizadas en líneas celulares silenciadas en PASK, pero a la vez existen algunas discrepancias. En las células de neuroblastoma silenciadas en PASK observamos que el aumento de los niveles de ATP y la menor expresión de LKB1 y CaMKK β acompañan la pérdida de la activación de AMPK a niveles bajos de glucosa y la hiperactivación de la vía mTOR/S6K1. De igual modo, mioblastos silenciados en PASK, poseen una mayor oxidación de glucosa y de palmitato y elevados niveles celulares de ATP (Hao et al., 2007), manteniendo inactiva la AMPK a baja concentración de glucosa.

La interpretación del fenotipo en ratones deficientes en PASK es difícil debido a la complejidad de los mecanismos de regulación. Varios sensores hipotalámicos detectan los niveles de nutrientes y pueden interrelacionarse entre sí y llevar a cabo mecanismos compensatorios. Además, la activación e inactivación de estos sensores está regulada por múltiples péptidos orexigénicos y anorexigénicos con la finalidad de regular la ingesta. De hecho, para añadir aún más complejidad, las respuestas de los diferentes sensores pueden ser diferentes según el área hipotalámica, como apuntan nuestros resultados, de acuerdo con la existencia de diferentes poblaciones neuronales (GE, GI) que llevan a cabo funciones opuestas en el mantenimiento de la homeostasis energética y del peso corporal. De todos modos, los estudios *in vitro* en células de neuroblastoma, donde los mecanismos de compensación están limitados, nos permite concluir que la PASK es un sensor de nutrientes y su función determina la respuesta a nutrientes de los otros sensores metabólicos.

También mostramos cómo la PASK es necesaria para mantener la expresión génica normal de varios genes (*Ampka2*, *Hipk2*) y su papel como mediador de los efectos de la exendina-4 en la regulación de los genes que codifican para LKB1, TSC2, Akt1 mTOR, eEF1- α 1, nNOS1.

En resumen, nuestros resultados muestran que PASK es un sensor de nutrientes en dos áreas hipotalámicas involucradas en la regulación de la ingesta (VMH y LH) con un perfil regulatorio diferente entre ellas, y que la función de PASK es decisiva para mantener la respuesta coordinada a los cambios de nutrientes de otros sensores metabólicos (AMPK y mTOR/S6K1) en estas áreas hipotalámicas. Asimismo, estos efectos no fueron específicos de cerebro y de modo análogo fueron observados en otros tejidos periféricos como, por ejemplo, el hígado. Además, PASK participa y es clave en la señalización iniciada por el GLP-1/exendina-4, al menos a nivel hipotalámico.

CONCLUSIONES

1. Las células neuronales N2A y GT1-7, así como los cultivos organotípicos de rodajas hipotalámicas de rata, detectan y responden a alteraciones en los niveles de glucosa y al péptido anorexigénico GLP-1.
2. La exposición a radiación por microondas de extractos celulares y tisulares es decisiva para preservar el estado de fosforilación que define el grado de activación/inactivación de las quinasas AMPK y S6K1.
3. La activación de AMPK y S6K1 es dependiente de la duración del tratamiento con glucosa en las líneas celulares N2A y GT1-7. Los niveles bajos de glucosa producen una rápida activación de AMPK, que persiste a lo largo del tiempo, mientras que son necesarias incubaciones más largas a elevadas concentraciones de glucosa para alcanzar la máxima activación de S6K1.
4. El péptido anorexigénico GLP-1 modula la actividad de AMPK y S6K1 en las líneas celulares N2A y GT1-7, así como en las áreas hipotalámicas VMH y LH. El GLP-1 revierte la máxima activación de ambas quinasas producida por fluctuaciones en los niveles de glucosa.
5. La glucosa y el GLP-1 regulan la expresión de los genes que codifican para AMPK y PASK de forma diferente en las áreas VMH y LH. El efecto del GLP-1 en la transcripción de estos genes es selectivo en función del área hipotalámica y de la concentración de glucosa.
6. La transducción de señales activadas por GLP-1 que conducen a la regulación de AMPK requiere la activación de las proteínas quinasas: PKA, PKC, PI3K, y también de proteínas fosfatasa como PP2. El efecto inhibitorio del GLP-1 en la fosforilación de S6K1 a alta concentración de glucosa requiere, al menos, la activación de PKA.
7. Las alteraciones de los niveles de nutrientes y hormonales originadas por la obesidad impiden la activación normal de la AMPK durante periodos de carestía nutricional en el VMH y LH de ratas Zucker.
8. La exendina-4 modula la activación de AMPK y S6K1 en respuesta a cambios en el estado nutricional (ayuno y re-alimentación) en ratas Zucker obesas y controles delgadas, intentando contrarrestar los efectos activadores/inhibidores de los nutrientes.

9. La PASK se expresa tanto en células de neuroblastoma como en áreas hipotalámicas implicadas en la regulación del balance energético y del peso corporal, y tanto la glucosa como el GLP-1 regulan su expresión.
10. Las células N2A silenciadas en PASK muestran alteraciones en el mecanismo sensor de glucosa de AMPK y mTOR/S6K1.
11. El efecto del GLP-1 sobre la actividad de AMPK, S6K1 y de otros intermediarios de estas vías, así como sobre la regulación de la expresión de algunos genes, se encuentra anulado en células silenciadas en PASK.
12. La ausencia de activación de la AMPK a bajas concentraciones de glucosa en células N2A silenciadas en PASK se correlaciona con: un incremento del contenido de ATP, una disminución de la expresión de la quinasa que activa la AMPK (LKB1) y un aumento en la activación de la S6K1.
13. La expresión de la PASK está regulada bajo condiciones de ayuno y realimentación, siendo modulada por la exendina-4. Los ratones deficientes en PASK presentan alteraciones en los mecanismos sensores de nutrientes de AMPK y mTOR/S6K1.
14. El efecto regulador de la exendina-4 en la actividad de los sensores metabólicos AMPK y mTOR/S6K1 se pierde en ratones deficientes en PASK y, además, las propiedades anorexigénicas de la exendina-4 se encuentran significativamente reducidas, indicando que la PASK actúa como un mediador en la vía de señalización del GLP-1.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, C.R., M. Rossi, A.M. Wren, K.G. Murphy, A.R. Kennedy, S.A. Stanley, A.N. Zollner, D.G. Morgan, I. Morgan, M.A. Ghatei, C.J. Small, and S.R. Bloom. 2001. Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology*. 142:3457-3463.
- Akieda-Asai, S., P.E. Poleni, K. Hasegawa, and Y. Date. 2014. Role of the neural pathway from hindbrain to hypothalamus in interaction of GLP1 and leptin in rats. *J Endocrinol*. 220:109-116.
- Alessi, D.R., L.R. Pearce, and J.M. Garcia-Martinez. 2009. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal*. 2:pe27.
- Alvarez, E., M.D. Martinez, I. Roncero, J.A. Chowen, B. Garcia-Cuartero, J.D. Gispert, C. Sanz, P. Vazquez, A. Maldonado, J. de Caceres, M. Desco, M.A. Pozo, and E. Blazquez. 2005. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem*. 92:798-806.
- Alvarez, E., I. Roncero, J.A. Chowen, B. Thorens, and E. Blazquez. 1996. Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem*. 66:920-927.
- Alvarez, E., I. Roncero, J.A. Chowen, P. Vazquez, and E. Blazquez. 2002. Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. *J Neurochem*. 80:45-53.
- An, R., G. da Silva Xavier, H.X. Hao, F. Semplici, J. Rutter, and G.A. Rutter. 2006. Regulation by Per-Arnt-Sim (PAS) kinase of pancreatic duodenal homeobox-1 nuclear import in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans*. 34:791-793.
- Anand, B.K., G.S. Chhina, K.N. Sharma, S. Dua, and B. Singh. 1964. Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *Am J Physiol*. 207:1146-1154.
- Andersson, U., K. Filipsson, C.R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S.R. Bloom, D. Carling, and C.J. Small. 2004. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem*. 279:12005-12008.
- Andrews, Z.B., Z.W. Liu, N. Wallingford, D.M. Erion, E. Borok, J.M. Friedman, M.H. Tschop, M. Shanabrough, G. Cline, G.I. Shulman, A. Coppola, X.B. Gao, T.L. Horvath, and S. Diano. 2008. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*. 454:846-851.
- Arora, S., and Anubhuti. 2006. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides*. 40:375-401.
- Ashford, M.L., P.R. Boden, and J.M. Treherne. 1990. Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflugers Arch*. 415:479-483.
- Badman, M.K., and J.S. Flier. 2005. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science*. 307:1909-1914.
- Baggio, L.L., and D.J. Drucker. 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 132:2131-2157.
- Barragan, J.M., J. Eng, R. Rodriguez, and E. Blazquez. 1999. Neural contribution to the effect of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on arterial blood pressure in rats. *Am J Physiol*. 277:E784-791.
- Beall, C., D.L. Hamilton, J. Gallagher, L. Logie, K. Wright, M.P. Soutar, S. Dadak, F.B. Ashford, E. Haythorne, Q. Du, A. Jovanovic, R.J. McCrimmon, and M.L. Ashford. 2012. Mouse hypothalamic GT1-7 cells demonstrate AMPK-dependent intrinsic glucose-sensing behaviour. *Diabetologia*. 55:2432-2444.

- Blanco Martinez de Morentin, P., C.R. Gonzalez, A.K. Saha, L. Martins, C. Dieguez, A. Vidal-Puig, M. Tena-Sempere, and M. Lopez. 2011. Hypothalamic AMP-activated protein kinase as a mediator of whole body energy balance. *Rev Endocr Metab Disord.* 12:127-140.
- Blazquez, E., E. Alvarez, M. Navarro, I. Roncero, F. Rodriguez-Fonseca, J.A. Chowen, and J.A. Zueco. 1998. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide as a novel neuropeptide. *Mol Neurobiol.* 18:157-173.
- Blonde, L., E.J. Klein, J. Han, B. Zhang, S.M. Mac, T.H. Poon, K.L. Taylor, M.E. Trautmann, D.D. Kim, and D.M. Kendall. 2006. Interim analysis of the effects of exenatide treatment on A1C, weight and cardiovascular risk factors over 82 weeks in 314 overweight patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 8:436-447.
- Blouet, C., H. Ono, and G.J. Schwartz. 2008. Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metab.* 8:459-467.
- Bolster, D.R., S.J. Crozier, S.R. Kimball, and L.S. Jefferson. 2002. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem.* 277:23977-23980.
- Borier, E., M. Niessen, R. Zuellig, G.A. Spinaz, P. Spielmann, G. Camenisch, and R.H. Wenger. 2007. Glucose-stimulated insulin production in mice deficient for the PAS kinase PASKIN. *Diabetes.* 56:113-117.
- Briaud, I., M.K. Lingohr, L.M. Dickson, C.E. Wrede, and C.J. Rhodes. 2003. Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 52:974-983.
- Broadwell, R.D., and M.W. Brightman. 1976. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol.* 166:257-283.
- Broberger, C. 2005. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med.* 258:301-327.
- Burcelin, R., and B. Thorens. 2001. Evidence that extrapancreatic GLUT2-dependent glucose sensors control glucagon secretion. *Diabetes.* 50:1282-1289.
- Burmeister, M.A., J. Ayala, D.J. Drucker, and J.E. Ayala. 2013. Central glucagon-like peptide 1 receptor-induced anorexia requires glucose metabolism-mediated suppression of AMPK and is impaired by central fructose. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* 304:E677-685.
- Burmeister, M.A., T. Ferre, J.E. Ayala, E.M. King, and R.M. Holt. 2012. Acute activation of central GLP-1 receptors enhances hepatic insulin action and insulin secretion in high-fat-fed, insulin resistant mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* 302:E334-343.
- Buse, J.B., J. Rosenstock, G. Sesti, W.E. Schmidt, E. Montanya, J.H. Brett, M. Zychma, and L. Blonde. 2009. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet.* 374:39-47.
- Cai, Y., Q. Wang, Z. Ling, D. Pipeleers, P. McDermott, M. Pende, H. Heimberg, and M. Van de Casteele. 2008. Akt activation protects pancreatic beta cells from AMPK-mediated death through stimulation of mTOR. *Biochem Pharmacol.* 75:1981-1993.
- Calvo, J.C., C.V. Gisolfi, E. Blazquez, and F. Mora. 1995a. Glucagon-like peptide-1(7-36)amide induces the release of aspartic acid and glutamine by the ventromedial hypothalamus of the conscious rat. *Brain Res Bull.* 38:435-439.
- Calvo, J.C., B. Yusta, F. Mora, and E. Blazquez. 1995b. Structural characterization by affinity cross-linking of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptor in rat brain. *J Neurochem.* 64:299-306.

- Canto, C., and J. Auwerx. 2010. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci.* 67:3407-3423.
- Cardon, C.M., and J. Rutter. 2012. PAS kinase: integrating nutrient sensing with nutrient partitioning. *Semin Cell Dev Biol.* 23:626-630.
- Claret, M., M.A. Smith, R.L. Batterham, C. Selman, A.I. Choudhury, L.G. Fryer, M. Clements, H. Al-Qassab, H. Heffron, A.W. Xu, J.R. Speakman, G.S. Barsh, B. Viollet, S. Vaulont, M.L. Ashford, D. Carling, and D.J. Withers. 2007. AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest.* 117:2325-2336.
- Cone, R.D., M.A. Cowley, A.A. Butler, W. Fan, D.L. Marks, and M.J. Low. 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25 Suppl 5:S63-67.
- Cooke, D., and S. Bloom. 2006. The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 5:919-931.
- Cota, D., E.K. Matter, S.C. Woods, and R.J. Seeley. 2008. The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci.* 28:7202-7208.
- Cota, D., K. Proulx, K.A. Smith, S.C. Kozma, G. Thomas, S.C. Woods, and R.J. Seeley. 2006. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science.* 312:927-930.
- Culmsee, C., J. Monnig, B.E. Kemp, and M.P. Mattson. 2001. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci.* 17:45-58.
- Chopra, I., H.F. Li, H. Wang, and K.A. Webster. 2012. Phosphorylation of the insulin receptor by AMP-activated protein kinase (AMPK) promotes ligand-independent activation of the insulin signalling pathway in rodent muscle. *Diabetologia.* 55:783-794.
- Chowen, J.A., F.R. de Fonseca, E. Alvarez, M. Navarro, L.M. Garcia-Segura, and E. Blazquez. 1999. Increased glucagon-like peptide-1 receptor expression in glia after mechanical lesion of the rat brain. *Neuropeptides.* 33:212-215.
- da Silva Xavier, G., H. Farhan, H. Kim, S. Caxaria, P. Johnson, S. Hughes, M. Bugliani, L. Marselli, P. Marchetti, F. Birzele, G. Sun, R. Scharfmann, J. Rutter, K. Siniakowicz, G. Weir, H. Parker, F. Reimann, F.M. Gribble, and G.A. Rutter. 2011. Per-arnt-sim (PAS) domain-containing protein kinase is downregulated in human islets in type 2 diabetes and regulates glucagon secretion. *Diabetologia.* 54:819-827.
- da Silva Xavier, G., I. Leclerc, I.P. Salt, B. Doiron, D.G. Hardie, A. Kahn, and G.A. Rutter. 2000. Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4023-4028.
- da Silva Xavier, G., J. Rutter, and G.A. Rutter. 2004. Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic duodenum homeobox 1 gene expression by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8319-8324.
- Dagon, Y., E. Hur, B. Zheng, K. Wellenstein, L.C. Cantley, and B.B. Kahn. 2012. p70S6 Kinase Phosphorylates AMPK on Serine 491 to Mediate Leptin's Effect on Food Intake. *Cell Metab.* 16:104-112.
- Djouder, N., R.D. Tuerk, M. Suter, P. Salvioni, R.F. Thali, R. Scholz, K. Vaahomeri, Y. Auchli, H. Rechsteiner, R.A. Brunisholz, B. Viollet, T.P. Makela, T. Wallimann, D. Neumann, and W. Krek. 2010. PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis. *EMBO J.* 29:469-481.
- Doyle, M.E., and J.M. Egan. 2007. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther.* 113:546-593.

- Dumont, Y., A. Fournier, and R. Quirion. 1998. Expression and characterization of the neuropeptide Y Y5 receptor subtype in the rat brain. *J Neurosci.* 18:5565-5574.
- Dunn-Meynell, A.A., N.E. Rawson, and B.E. Levin. 1998. Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺ channel in rat brain. *Brain Res.* 814:41-54.
- Dzamko, N., B.J. van Denderen, A.L. Hevener, S.B. Jorgensen, J. Honeyman, S. Galic, Z.P. Chen, M.J. Watt, D.J. Campbell, G.R. Steinberg, and B.E. Kemp. 2010. AMPK beta1 deletion reduces appetite, preventing obesity and hepatic insulin resistance. *J Biol Chem.* 285:115-122.
- Eckhardt, K., J. Troger, J. Reissmann, D.M. Katschinski, K.F. Wagner, P. Stengel, U. Paasch, P. Hunziker, E. Bortler, S. Barth, P. Schlafli, P. Spielmann, D.P. Stiehl, G. Camenisch, and R.H. Wenger. 2007. Male germ cell expression of the PAS domain kinase PASKIN and its novel target eukaryotic translation elongation factor eEF1A1. *Cell Physiol Biochem.* 20:227-240.
- Fan, X., Y. Ding, S. Brown, L. Zhou, M. Shaw, M.C. Vella, H. Cheng, E.C. McNay, R.S. Sherwin, and R.J. McCrimmon. 2009. Hypothalamic AMP-activated protein kinase activation with AICAR amplifies counterregulatory responses to hypoglycemia in a rodent model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296:R1702-1708.
- Flint, A., A. Raben, A. Astrup, and J.J. Holst. 1998. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest.* 101:515-520.
- Fontes, G., M. Semache, D.K. Hagman, C. Tremblay, R. Shah, C.J. Rhodes, J. Rutter, and V. Poitout. 2009. Involvement of Per-Arnt-Sim Kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 58:2048-2058.
- Foster, K.G., and D.C. Fingar. 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem.* 285:14071-14077.
- Garcia-Haro, L., M.A. Garcia-Gimeno, D. Neumann, M. Beullens, M. Bollen, and P. Sanz. 2010. The PP1-R6 protein phosphatase holoenzyme is involved in the glucose-induced dephosphorylation and inactivation of AMP-activated protein kinase, a key regulator of insulin secretion, in MIN6 beta cells. *Faseb J.* 24:5080-5091.
- Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg. 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15:807-826.
- Glass, M.J., J. Chan, and V.M. Pickel. 2002. Ultrastructural localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat medial nucleus tractus solitarius: relationships with neuropeptide Y or catecholamine neurons. *J Neurosci Res.* 67:753-765.
- Goke, R., P.J. Larsen, J.D. Mikkelsen, and S.P. Sheikh. 1995. Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci.* 7:2294-2300.
- Grose, J.H., and J. Rutter. 2010. The role of PAS kinase in PASsing the glucose signal. *Sensors (Basel).* 10:5668-5682.
- Gutniak, M., C. Orskov, J.J. Holst, B. Ahren, and S. Efendic. 1992. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 326:1316-1322.
- Gutzwiller, J.P., B. Goke, J. Drewe, P. Hildebrand, S. Ketterer, D. Handschin, R. Winterhalder, D. Conen, and C. Beglinger. 1999. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut.* 44:81-86.
- Gutzwiller, J.P., P. Hruz, A.R. Huber, C. Hamel, C. Zehnder, J. Drewe, H. Gutmann, Z. Stanga, D. Vogel, and C. Beglinger. 2006. Glucagon-like peptide-1 is involved in sodium and water homeostasis in humans. *Digestion.* 73:142-150.

- Gutzwiller, J.P., S. Tschopp, A. Bock, C.E. Zehnder, A.R. Huber, M. Kreyenbuehl, H. Gutmann, J. Drewe, C. Henzen, B. Goeke, and C. Beglinger. 2004. Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis in healthy subjects and in insulin-resistant obese men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 89:3055-3061.
- Hao, H.X., C.M. Cardon, W. Swiatek, R.C. Cooksey, T.L. Smith, J. Wilde, S. Boudina, E.D. Abel, D.A. McClain, and J. Rutter. 2007. PAS kinase is required for normal cellular energy balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:15466-15471.
- Hao, H.X., and J. Rutter. 2008. The role of PAS kinase in regulating energy metabolism. *IUBMB Life*. 60:204-209.
- Hardie, D.G., D. Carling, and M. Carlson. 1998. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem*. 67:821-855.
- Hardie, D.G., S.A. Hawley, and J.W. Scott. 2006. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol*. 574:7-15.
- Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13:251-262.
- Harrold, J.A., T.M. Dovey, J.E. Blundell, and J.C. Halford. 2012. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*. 63:3-17.
- Hayes, M.R., T.M. Lechner, S. Zhao, G.S. Lee, A. Chowansky, D. Zimmer, B.C. De Jonghe, S.E. Kanoski, H.J. Grill, and K.K. Bence. 2011. Intracellular signals mediating the food intake-suppressive effects of hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation. *Cell Metab*. 13:320-330.
- Hayes, M.R., K.P. Skibicka, K.K. Bence, and H.J. Grill. 2009. Dorsal hindbrain 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase as an intracellular mediator of energy balance. *Endocrinology*. 150:2175-2182.
- Hetherington, A.W., and S.W. Ranson. 1942. The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *J. Comp.Neurol*. 76:475-499.
- Hillebrand, J.J., D. de Wied, and R.A. Adan. 2002. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*. 23:2283-2306.
- Hofer, T., P. Spielmann, P. Stengel, B. Stier, D.M. Katschinski, I. Desbaillets, M. Gassmann, and R.H. Wenger. 2001. Mammalian PASKIN, a PAS-serine/threonine kinase related to bacterial oxygen sensors. *Biochem Biophys Res Commun*. 288:757-764.
- Holmes, C.L., B.M. Patel, J.A. Russell, and K.R. Walley. 2001. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest*. 120:989-1002.
- Holst, J.J. 2007. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*. 87:1409-1439.
- Holst, J.J., Orskov, C. 1994. Glucagon and other proglucagon-derived peptides. . Raven, New York. .
- Hurtado-Carneiro, V., I. Roncero, E. Blazquez, E. Alvarez, and C. Sanz. 2013. Glucagon-like peptide-1 and its implications in obesity. In *Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases*. M. Fedele, editor. INTECH, Italy.
- Inoki, K., H. Ouyang, T. Zhu, C. Lindvall, Y. Wang, X. Zhang, Q. Yang, C. Bennett, Y. Harada, K. Stankunas, C.Y. Wang, X. He, O.A. MacDougald, M. You, B.O. Williams, and K.L. Guan. 2006. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*. 126:955-968.
- Ip, C.K., and A.S. Wong. 2012. p70 S6 kinase and actin dynamics: A perspective. *Spermatogenesis*. 2:44-52.
- Itani, S.I., A.K. Saha, T.G. Kurowski, H.R. Coffin, K. Tornheim, and N.B. Ruderman. 2003. Glucose autoregulates its uptake in skeletal muscle: involvement of AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 52:1635-1640.

- Janssen, P., A. Rotondo, F. Mule, and J. Tack. 2013. Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Aliment Pharmacol Ther.* 37:18-36.
- Jewell, J.L., and K.L. Guan. 2013. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem Sci.* 38:233-242.
- Jordan, S.D., A.C. Konner, and J.C. Bruning. 2010. Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 67:3255-3273.
- Kalra, S.P., M.G. Dube, S. Pu, B. Xu, T.L. Horvath, and P.S. Kalra. 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 20:68-100.
- Kang, L., V.H. Routh, E.V. Kuzhikandathil, L.D. Gaspers, and B.E. Levin. 2004. Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes.* 53:549-559.
- Kanse, S.M., B. Kreymann, M.A. Ghatei, and S.R. Bloom. 1988. Identification and characterization of glucagon-like peptide-1 7-36 amide-binding sites in the rat brain and lung. *FEBS Lett.* 241:209-212.
- Katschinski, D.M., H.H. Marti, K.F. Wagner, J. Shibata, K. Eckhardt, F. Martin, R. Depping, U. Paasch, M. Gassmann, B. Ledermann, I. Desbaillets, and R.H. Wenger. 2003. Targeted disruption of the mouse PAS domain serine/threonine kinase PASKIN. *Mol Cell Biol.* 23:6780-6789.
- Khamzina, L., A. Veilleux, S. Bergeron, and A. Marette. 2005. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology.* 146:1473-1481.
- Kikani, C.K., S.A. Antonyamy, J.B. Bonanno, R. Romero, F.F. Zhang, M. Russell, T. Gheyi, M. Iizuka, S. Emtage, J.M. Sauder, B.E. Turk, S.K. Burley, and J. Rutter. 2010. Structural bases of PAS domain-regulated kinase (PASK) activation in the absence of activation loop phosphorylation. *J Biol Chem.* 285:41034-41043.
- Kim, E.K., I. Miller, S. Aja, L.E. Landree, M. Pinn, J. McFadden, F.P. Kuhajda, T.H. Moran, and G.V. Ronnett. 2004a. C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 279:19970-19976.
- Kim, M.S., J.Y. Park, C. Namkoong, P.G. Jang, J.W. Ryu, H.S. Song, J.Y. Yun, I.S. Namgoong, J. Ha, I.S. Park, I.K. Lee, B. Viollet, J.H. Youn, H.K. Lee, and K.U. Lee. 2004b. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 10:727-733.
- Kimura, N., C. Tokunaga, S. Dalal, C. Richardson, K. Yoshino, K. Hara, B.E. Kemp, L.A. Witters, O. Mimura, and K. Yonezawa. 2003. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells.* 8:65-79.
- Kirchgessner, A.L., and M. Liu. 1999. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron.* 24:941-951.
- Kodiha, M., J.G. Rassi, C.M. Brown, and U. Stochaj. 2007. Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK-->ERK1/2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293:C1427-1436.
- Kohno, D., H. Sone, S. Tanaka, H. Kurita, D. Gantulga, and T. Yada. 2011. AMP-activated protein kinase activates neuropeptide Y neurons in the hypothalamic arcuate nucleus to increase food intake in rats. *Neurosci Lett.* 499:194-198.
- Kola, B., M. Boscaro, G.A. Rutter, A.B. Grossman, and M. Kordonits. 2006. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab.* 17:205-215.
- Kola, B., E. Hubina, S.A. Tucci, T.C. Kirkham, E.A. Garcia, S.E. Mitchell, L.M. Williams, S.A. Hawley, D.G. Hardie, A.B. Grossman, and M. Kordonits. 2005. Cannabinoids

- and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 280:25196-25201.
- Konturek, S.J., J. Pepera, K. Zabielski, P.C. Konturek, T. Pawlik, A. Szlachcic, and E.G. Hahn. 2003. Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control. *J Physiol Pharmacol.* 54:293-317.
- Koyama, Y., R.H. Coker, E.E. Stone, D.B. Lacy, K. Jabbour, P.E. Williams, and D.H. Wasserman. 2000. Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. *Diabetes.* 49:1434-1442.
- Kreymann, B., G. Williams, M.A. Ghatei, and S.R. Bloom. 1987. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet.* 2:1300-1304.
- Kristensen, P., M.E. Judge, L. Thim, U. Ribel, K.N. Christjansen, B.S. Wulff, J.T. Clausen, P.B. Jensen, O.D. Madsen, N. Vrang, P.J. Larsen, and S. Hastrup. 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature.* 393:72-76.
- Kubota, N., W. Yano, T. Kubota, T. Yamauchi, S. Itoh, H. Kumagai, H. Kozono, I. Takamoto, S. Okamoto, T. Shiuchi, R. Suzuki, H. Satoh, A. Tsuchida, M. Moroi, K. Sugi, T. Noda, H. Ebinuma, Y. Ueta, T. Kondo, E. Araki, O. Ezaki, R. Nagai, K. Tobe, Y. Terauchi, K. Ueki, Y. Minokoshi, and T. Kadowaki. 2007. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* 6:55-68.
- Lage, R., C. Dieguez, A. Vidal-Puig, and M. Lopez. 2008. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med.* 14:539-549.
- Lane, M.D., and S.H. Cha. 2009. Effect of glucose and fructose on food intake via malonyl-CoA signaling in the brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 382:1-5.
- Lee, K., B. Li, X. Xi, Y. Suh, and R.J. Martin. 2005. Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology.* 146:3-10.
- Leibowitz, S.F., and K.E. Wortley. 2004. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides.* 25:473-504.
- Levin, B.E., A.A. Dunn-Meynell, and V.H. Routh. 1999. Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes. *Am J Physiol.* 276:R1223-1231.
- Levin, B.E., V.H. Routh, L. Kang, N.M. Sanders, and A.A. Dunn-Meynell. 2004. Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes.* 53:2521-2528.
- Lim, C.T., B. Kola, and M. Korbonits. 2010. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol.* 44:87-97.
- Lindsley, J.E., and J. Rutter. 2004. Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 139:543-559.
- Long, Y.C., and J.R. Zierath. 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest.* 116:1776-1783.
- Lopaschuk, G.D., J.R. Ussher, and J.S. Jaswal. 2010. Targeting intermediary metabolism in the hypothalamus as a mechanism to regulate appetite. *Pharmacol Rev.* 62:237-264.
- MacDonald, P.E., and P. Rorsman. 2011. Per-arnt-sim (PAS) domain kinase (PASK) as a regulator of glucagon secretion. *Diabetologia.* 54:719-721.
- Magnuson, B., B. Ekim, and D.C. Fingar. 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* 441:1-21.
- Manzoni, C., L. Colombo, P. Bigini, V. Diana, A. Cagnotto, M. Messa, M. Lupi, V. Bonetto, M. Pignataro, C. Airoidi, E. Sironi, A. Williams, and M. Salmona. 2011. The molecular assembly of amyloid abeta controls its neurotoxicity and binding to cellular proteins. *PLoS One.* 6:e24909.

- Martin, T.L., T. Alquier, K. Asakura, N. Furukawa, F. Preitner, and B.B. Kahn. 2006. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem.* 281:18933-18941.
- Martinez, J.A., and A. Solomon. 2006. Participación del sistema nervioso y del tracto gastrointestinal en la homeostasis energética. *Rev. Med.Univ.Navarra.* 50:30.
- Martins, L., D. Fernandez-Mallo, M.G. Novelle, M.J. Vazquez, M. Tena-Sempere, R. Nogueiras, M. Lopez, and C. Dieguez. 2012. Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. *PLoS One.* 7:e46923.
- Marty, N., M. Dallaporta, and B. Thorens. 2007. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda).* 22:241-251.
- Matschinsky, F.M. 1990. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes.* 39:647-652.
- Matveyenko, A.V., and C.M. Donovan. 2006. Metabolic sensors mediate hypoglycemic detection at the portal vein. *Diabetes.* 55:1276-1282.
- McCrimmon, R.J., X. Fan, H. Cheng, E. McNay, O. Chan, M. Shaw, Y. Ding, W. Zhu, and R.S. Sherwin. 2006. Activation of AMP-activated protein kinase within the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses in rats with defective counterregulation. *Diabetes.* 55:1755-1760.
- McCrimmon, R.J., X. Fan, Y. Ding, W. Zhu, R.J. Jacob, and R.S. Sherwin. 2004. Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus. *Diabetes.* 53:1953-1958.
- McCrimmon, R.J., M. Shaw, X. Fan, H. Cheng, Y. Ding, M.C. Vella, L. Zhou, E.C. McNay, and R.S. Sherwin. 2008. Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes.* 57:444-450.
- Mellon, P.L., J.J. Windle, P.C. Goldsmith, C.A. Padula, J.L. Roberts, and R.I. Weiner. 1990. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron.* 5:1-10.
- Mihaylova, M.M., and R.J. Shaw. 2011. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 13:1016-1023.
- Minokoshi, Y., T. Alquier, N. Furukawa, Y.B. Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Foufelle, P. Ferre, M.J. Birnbaum, B.J. Stuck, and B.B. Kahn. 2004. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature.* 428:569-574.
- Minokoshi, Y., Y.B. Kim, O.D. Peroni, L.G. Fryer, C. Muller, D. Carling, and B.B. Kahn. 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* 415:339-343.
- Mizuno, Y., and Y. Oomura. 1984. Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. *Brain Res.* 307:109-116.
- Montagne, J., M.J. Stewart, H. Stocker, E. Hafen, S.C. Kozma, and G. Thomas. 1999. Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science.* 285:2126-2129.
- Montanya, E., and G. Sesti. 2009. A review of efficacy and safety data regarding the use of liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther.* 31:2472-2488.
- Mora, F., I. Exposito, B. Sanz, and E. Blazquez. 1992. Selective release of glutamine and glutamic acid produced by perfusion of GLP-1 (7-36) amide in the basal ganglia of the conscious rat. *Brain Res Bull.* 29:359-361.
- Mori, H., K. Inoki, K. Masutani, Y. Wakabayashi, K. Komai, R. Nakagawa, K.L. Guan, and A. Yoshimura. 2009a. The mTOR pathway is highly activated in diabetic

- nephropathy and rapamycin has a strong therapeutic potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 384:471-475.
- Mori, H., K. Inoki, H. Munzberg, D. Opland, M. Faouzi, E.C. Villanueva, T. Ikenoue, D. Kwiatkowski, O.A. MacDougald, M.G. Myers, Jr., and K.L. Guan. 2009b. Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell Metab.* 9:362-374.
- Mountjoy, P.D., S.J. Bailey, and G.A. Rutter. 2007. Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity. *Diabetologia.* 50:168-177.
- Mountjoy, P.D., and G.A. Rutter. 2007. Glucose sensing by hypothalamic neurones and pancreatic islet cells: AMPle evidence for common mechanisms? *Exp Physiol.* 92:311-319.
- Murphy, B.A., K.A. Fakira, Z. Song, A. Beuve, and V.H. Routh. 2009. AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons. *Am J Physiol Cell Physiol.* 297:C750-758.
- Nakano, Y., Y. Oomura, L. Lenard, H. Nishino, S. Aou, T. Yamamoto, and K. Aoyagi. 1986. Feeding-related activity of glucose- and morphine-sensitive neurons in the monkey amygdala. *Brain Res.* 399:167-172.
- Naslund, E., M. Ehrstrom, J. Ma, P.M. Hellstrom, and A.L. Kirchgessner. 2002. Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 282:G470-479.
- Naslund, E., M. Gutniak, S. Skogar, S. Rossner, and P.M. Hellstrom. 1998. Glucagon-like peptide 1 increases the period of postprandial satiety and slows gastric emptying in obese men. *Am J Clin Nutr.* 68:525-530.
- Nauck, M., F. Stockmann, R. Ebert, and W. Creutzfeldt. 1986. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 29:46-52.
- Navarro, M., F. Rodriguez de Fonseca, E. Alvarez, J.A. Chowen, J.A. Zueco, R. Gomez, J. Eng, and E. Blazquez. 1996. Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem.* 67:1982-1991.
- Niswender, K. 2010. Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction - a complex interplay. *Diabetes Obes Metab.* 12:267-287.
- Niswender, K.D., C.D. Morrison, D.J. Clegg, R. Olson, D.G. Baskin, M.G. Myers, Jr., R.J. Seeley, and M.W. Schwartz. 2003. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes.* 52:227-231.
- Niswender, K.D., G.J. Morton, W.H. Stearns, C.J. Rhodes, M.G. Myers, Jr., and M.W. Schwartz. 2001. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature.* 413:794-795.
- Ono, H., A. Pocai, Y. Wang, H. Sakoda, T. Asano, J.M. Backer, G.J. Schwartz, and L. Rossetti. 2008. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest.* 118:2959-2968.
- Oomura, Y., T. Ono, H. Ooyama, and M.J. Wayner. 1969. Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature.* 222:282-284.
- Oomura, Y., and H. Yoshimatsu. 1984. Neural network of glucose monitoring system. *J Auton Nerv Syst.* 10:359-372.
- Orskov, C., S.S. Poulsen, M. Moller, and J.J. Holst. 1996. Glucagon-like peptide I receptors in the subfornical organ and the area postrema are accessible to circulating glucagon-like peptide I. *Diabetes.* 45:832-835.

- Parker, J.A., and S.R. Bloom. 2012. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology*. 63:18-30.
- Pende, M., S.C. Kozma, M. Jaquet, V. Oorschot, R. Burcelin, Y. Le Marchand-Brustel, J. Klumperman, B. Thorens, and G. Thomas. 2000. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*. 408:994-997.
- Perry, B., and Y. Wang. 2012. Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. *Nutr Diabetes*. 2:e26.
- Peyron, C., D.K. Tighe, A.N. van den Pol, L. de Lecea, H.C. Heller, J.G. Sutcliffe, and T.S. Kilduff. 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*. 18:9996-10015.
- Pimentel, G.D., E.R. Ropelle, G.Z. Rocha, and J.B. Carvalheira. 2013. The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. *Metabolism*. 62:171-178.
- Poitout, V., and R.P. Robertson. 2008. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*. 29:351-366.
- Poleni, P.E., S. Akieda-Asai, S. Koda, M. Sakurai, C.R. Bae, K. Senba, Y.S. Cha, M. Furuya, and Y. Date. 2012. Possible involvement of melanocortin-4-receptor and AMP-activated protein kinase in the interaction of glucagon-like peptide-1 and leptin on feeding in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 420:36-41.
- Pospisilik, J.A., S.G. Stafford, H.U. Demuth, C.H. McIntosh, and R.A. Pederson. 2002. Long-term treatment with dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in the VDF Zucker rat: a euglycemic-hyperinsulinemic clamp study. *Diabetes*. 51:2677-2683.
- Proud, C.G. 2002. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem*. 269:5338-5349.
- Qu, D., D.S. Ludwig, S. Gammeltoft, M. Piper, M.A. Pelleymounter, M.J. Cullen, W.F. Mathes, R. Przypek, R. Kanarek, and E. Maratos-Flier. 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*. 380:243-247.
- Ramamurthy, S., and G. Ronnett. 2012. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and Energy-Sensing in the Brain. *Exp Neurobiol*. 21:52-60.
- Raybould, H.E. 2007. Sensing of glucose in the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci*. 133:86-90.
- Reed, A.S., E.K. Unger, L.E. Olofsson, M.L. Piper, M.G. Myers, Jr., and A.W. Xu. 2010. Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes*. 59:894-906.
- Reusch, C.E., and I. Padruitt. 2013. New incretin hormonal therapies in humans relevant to diabetic cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 43:417-433.
- Rodriguez de Fonseca, F., M. Navarro, E. Alvarez, I. Roncero, J.A. Chowen, O. Maestre, R. Gomez, R.M. Munoz, J. Eng, and E. Blazquez. 2000. Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism*. 49:709-717.
- Rohas, L.M., J. St-Pierre, M. Uldry, S. Jager, C. Handschin, and B.M. Spiegelman. 2007. A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:7933-7938.
- Roncero, I., E. Alvarez, J.A. Chowen, C. Sanz, A. Rabano, P. Vazquez, and E. Blazquez. 2004. Expression of glucose transporter isoform GLUT-2 and glucokinase genes in human brain. *J Neurochem*. 88:1203-1210.

- Roncero, I., E. Alvarez, P. Vazquez, and E. Blazquez. 2000. Functional glucokinase isoforms are expressed in rat brain. *J Neurochem.* 74:1848-1857.
- Ropelle, E.R., J.R. Pauli, M.F. Fernandes, S.A. Rocco, R.M. Marin, J. Morari, K.K. Souza, M.M. Dias, M.C. Gomes-Marcondes, J.A. Gontijo, K.G. Franchini, L.A. Velloso, M.J. Saad, and J.B. Carnevali. 2008. A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes.* 57:594-605.
- Rupprecht, L.E., E.G. Mietlicki-Baase, D.J. Zimmer, L.E. McGrath, D.R. Olivos, and M.R. Hayes. 2013. Hindbrain GLP-1 receptor-mediated suppression of food intake requires a PI3K-dependent decrease in phosphorylation of membrane-bound Akt. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* 305:E751-759.
- Rutter, G.A., G. Da Silva Xavier, and I. Leclerc. 2003. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J.* 375:1-16.
- Rutter, G.A., and I. Leclerc. 2009. The AMP-regulated kinase family: enigmatic targets for diabetes therapy. *Mol Cell Endocrinol.* 297:41-49.
- Rutter, J., C.H. Michnoff, S.M. Harper, K.H. Gardner, and S.L. McKnight. 2001. PAS kinase: an evolutionarily conserved PAS domain-regulated serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:8991-8996.
- Sakamoto, K., A. McCarthy, D. Smith, K.A. Green, D. Grahame Hardie, A. Ashworth, and D.R. Alessi. 2005. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J.* 24:1810-1820.
- Salcedo, I., D. Tweedie, Y. Li, and N.H. Greig. 2012. Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders. *Br J Pharmacol.* 166:1586-1599.
- Salt, I.P., G. Johnson, S.J. Ashcroft, and D.G. Hardie. 1998. AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. *Biochem J.* 335 (Pt 3):533-539.
- Sam, A.H., R.C. Troke, T.M. Tan, and G.A. Bewick. 2012. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology.* 63:46-56.
- Sanders, M.J., P.O. Grondin, B.D. Hegarty, M.A. Snowden, and D. Carling. 2007. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J.* 403:139-148.
- Sandoval, D., J.G. Barrera, M.A. Stefater, S. Sisley, S.C. Woods, D.D. D'Alessio, and R.J. Seeley. 2012. The anorectic effect of GLP-1 in rats is nutrient dependent. *PLoS One.* 7:e51870.
- Sanz, C., I. Roncero, E. Alvarez, V. Hurtado, and E. Blazquez. 2011. Glucokinase as a glucose sensor in hypothalamus. Regulation by orexigenic and anorexigenic peptides. In *Update on mechanisms of hormone action. Focus on metabolism, growth and reproductions.* G. Aimaretti, editor. INTECH, Croatia.
- Sanz, C., I. Roncero, P. Vazquez, M.A. Navas, and E. Blazquez. 2007. Effects of glucose and insulin on glucokinase activity in rat hypothalamus. *J Endocrinol.* 193:259-267.
- Sanz, C., P. Vazquez, M.A. Navas, E. Alvarez, and E. Blazquez. 2008. Leptin but not neuropeptide Y up-regulated glucagon-like peptide 1 receptor expression in GT1-7 cells and rat hypothalamic slices. *Metabolism.* 57:40-48.
- Scharf, M.T., M. Mackiewicz, N. Naidoo, J.P. O'Callaghan, and A.I. Pack. 2008. AMP-activated protein kinase phosphorylation in brain is dependent on method of killing and tissue preparation. *J Neurochem.* 105:833-841.
- Schjoldager, B.T., P.E. Mortensen, J. Christiansen, C. Orskov, and J.J. Holst. 1989. GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. *Dig Dis Sci.* 34:703-708.

- Schlaefli, P., E. Bortner, P. Spielmann, and R.H. Wenger. 2009. The PAS-domain kinase PASKIN: a new sensor in energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 66:876-883.
- Schlaefli, P., J. Troger, K. Eckhardt, E. Bortner, P. Spielmann, and R.H. Wenger. 2011. Substrate preference and phosphatidylinositol monophosphate inhibition of the catalytic domain of the Per-Arnt-Sim domain kinase PASKIN. *FEBS J.* 278:1757-1768.
- Schwartz, M.W., S.C. Woods, D. Porte, Jr., R.J. Seeley, and D.G. Baskin. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 404:661-671.
- Semache, M., B. Zarrouki, G. Fontes, S. Fogarty, C. Kikani, M.B. Chawki, J. Rutter, and V. Poitout. 2013. Per-Arnt-Sim Kinase Regulates Pancreatic Duodenal Homeobox-1 Protein Stability via Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 β in Pancreatic β -Cells. *J Biol Chem.* 288:24825-24833.
- Semplici, F., M. Vaxillaire, S. Fogarty, M. Semache, A. Bonnefond, G. Fontes, J. Philippe, G. Meur, F. Diraison, R.B. Sessions, J. Rutter, V. Poitout, P. Froguel, and G.A. Rutter. 2011. Human mutation within Per-Arnt-Sim (PAS) domain-containing protein kinase (PASK) causes basal insulin hypersecretion. *J Biol Chem.* 286:44005-44014.
- Seo, S., S. Ju, H. Chung, D. Lee, and S. Park. 2008. Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *Endocr J.* 55:867-874.
- Shaw, R.J., K.A. Lamia, D. Vasquez, S.H. Koo, N. Bardeesy, R.A. Depinho, M. Montminy, and L.C. Cantley. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science.* 310:1642-1646.
- Shimizu, I., M. Hirota, C. Ohboshi, and K. Shima. 1987. Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in rat brain. *Endocrinology.* 121:1076-1082.
- Shiraishi, T. 1991. Noradrenergic neurons modulate lateral hypothalamic chemical and electrical stimulation-induced feeding by sated rats. *Brain Res Bull.* 27:347-351.
- Silver, I.A., and M. Erecinska. 1994. Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci.* 14:5068-5076.
- Solomon, A., B.A. De Fanti, and J.A. Martinez. 2006. Peripheral ghrelin participates in the glucostatic signaling mediated by the ventromedial and lateral hypothalamus neurons. *Peptides.* 27:1607-1615.
- Song, Z., B.E. Levin, J.J. McArdle, N. Bakhos, and V.H. Routh. 2001. Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes.* 50:2673-2681.
- Stanley, S., K. Wynne, B. McGowan, and S. Bloom. 2005. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev.* 85:1131-1158.
- Stark, R., S.E. Ashley, and Z.B. Andrews. 2013. AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol Cell Endocrinol.* 366:215-223.
- Steinberg, G.R., and B.E. Kemp. 2009. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev.* 89:1025-1078.
- Su, H., L. Jiang, C. Carter-Su, and L. Rui. 2012. Glucose enhances leptin signaling through modulation of AMPK activity. *PLoS One.* 7:e31636.
- Suzuki, K., C.N. Jayasena, and S.R. Bloom. 2012. Obesity and appetite control. *Exp Diabetes Res.* 2012:824305.
- Suzuki, K., K.A. Simpson, J.S. Minnion, J.C. Shillito, and S.R. Bloom. 2010. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J.* 57:359-372.

- Tang-Christensen, M., P.J. Larsen, R. Goke, A. Fink-Jensen, D.S. Jessop, M. Moller, and S.P. Sheikh. 1996. Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol.* 271:R848-856.
- Ter Horst, G.J., P. de Boer, P.G. Luiten, and J.D. van Willigen. 1989. Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience.* 31:785-797.
- Towler, M.C., and D.G. Hardie. 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 100:328-341.
- Turnley, A.M., D. Stapleton, R.J. Mann, L.A. Witters, B.E. Kemp, and P.F. Bartlett. 1999. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem.* 72:1707-1716.
- Turton, M.D., D. O'Shea, I. Gunn, S.A. Beak, C.M. Edwards, K. Meeran, S.J. Choi, G.M. Taylor, M.M. Heath, P.D. Lambert, J.P. Wilding, D.M. Smith, M.A. Ghatei, J. Herbert, and S.R. Bloom. 1996. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature.* 379:69-72.
- Um, S.H., F. Frigerio, M. Watanabe, F. Picard, M. Joaquin, M. Sticker, S. Fumagalli, P.R. Allegrini, S.C. Kozma, J. Auwerx, and G. Thomas. 2004. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature.* 431:200-205.
- Uttenthal, L.O., A. Toledano, and E. Blazquez. 1992. Autoradiographic localization of receptors for glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in rat brain. *Neuropeptides.* 21:143-146.
- Valverde, I., M.L. Villanueva-Penacarrillo, and W.J. Malaisse. 2002. Pancreatic and extrapancreatic effects of GLP-1. *Diabetes Metab.* 28:3S85-89; discussion 83S108-112.
- van der Kooy, D., L.Y. Koda, J.F. McGinty, C.R. Gerfen, and F.E. Bloom. 1984. The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol.* 224:1-24.
- Vara, E., J. Arias-Diaz, C. Garcia, J.L. Balibrea, and E. Blazquez. 2001. Glucagon-like peptide-1(7-36) amide stimulates surfactant secretion in human type II pneumocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:840-846.
- Varela, L., M.J. Vazquez, F. Cordido, R. Nogueiras, A. Vidal-Puig, C. Dieguez, and M. Lopez. 2011. Ghrelin and lipid metabolism: key partners in energy balance. *J Mol Endocrinol.* 46:R43-63.
- Verdich, C., A. Flint, J.P. Gutzwiller, E. Naslund, C. Beglinger, P.M. Hellstrom, S.J. Long, L.M. Morgan, J.J. Holst, and A. Astrup. 2001. A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 86:4382-4389.
- Villanueva, E.C., H. Munzberg, D. Cota, R.L. Leshan, K. Kopp, R. Ishida-Takahashi, J.C. Jones, D.C. Fingar, R.J. Seeley, and M.G. Myers, Jr. 2009. Complex regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 in the basomedial hypothalamus by leptin and nutritional status. *Endocrinology.* 150:4541-4551.
- Viollet, B., Y. Athes, R. Mounier, B. Guigas, E. Zarrinpashneh, S. Horman, L. Lantier, S. Hebrard, J. Devin-Leclerc, C. Beauloye, M. Foretz, F. Andreelli, R. Ventura-Clapier, and L. Bertrand. 2009. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci.* 14:19-44.
- Wadikar, D.D., and K.S. Premavalli. 2012. Appetite control and obesity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 52:949-956.
- Wang, R., X. Liu, S.T. Hentges, A.A. Dunn-Meynell, B.E. Levin, W. Wang, and V.H. Routh. 2004. The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes.* 53:1959-1965.

- Wilson, W.A., A.V. Skurat, B. Probst, A. de Paoli-Roach, P.J. Roach, and J. Rutter. 2005. Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:16596-16601.
- Williams, D.L. 2009. Minireview: finding the sweet spot: peripheral versus central glucagon-like peptide 1 action in feeding and glucose homeostasis. *Endocrinology*. 150:2997-3001.
- Williams, D.L., D.G. Baskin, and M.W. Schwartz. 2009. Evidence that intestinal glucagon-like peptide-1 plays a physiological role in satiety. *Endocrinology*. 150:1680-1687.
- Williams, G., J.A. Harrold, and D.J. Cutler. 2000. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc*. 59:385-396.
- Woods, A., D. Vertommen, D. Neumann, R. Turk, J. Bayliss, U. Schlattner, T. Wallimann, D. Carling, and M.H. Rider. 2003. Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 278:28434-28442.
- Woods, S.C. 2004. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 286:G7-13.
- Xiao, B., M.J. Sanders, E. Underwood, R. Heath, F.V. Mayer, D. Carmena, C. Jing, P.A. Walker, J.F. Eccleston, L.F. Haire, P. Saiu, S.A. Howell, R. Aasland, S.R. Martin, D. Carling, and S.J. Gamblin. 2011. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*. 472:230-233.
- Xu, J., J. Ji, and X.H. Yan. 2012. Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 52:373-381.
- Xue, B., T. Pulinilkunnil, I. Murano, K.K. Bence, H. He, Y. Minokoshi, K. Asakura, A. Lee, F. Haj, N. Furukawa, K.J. Catalano, M. Delibegovic, J.A. Balschi, S. Cinti, B.G. Neel, and B.B. Kahn. 2009. Neuronal protein tyrosine phosphatase 1B deficiency results in inhibition of hypothalamic AMPK and isoform-specific activation of AMPK in peripheral tissues. *Mol Cell Biol*. 29:4563-4573.
- Yu, J.H., and M.S. Kim. 2012. Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab J*. 36:391-398.
- Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:21-35.

UPDATE ON MECHANISMS OF HORMONE ACTION – FOCUS ON METABOLISM, GROWTH AND REPRODUCTIONS

Edited by **Gianluca Aimaretti**
Co-Editors: **Paolo Marzullo** and **Flavia Prodam**

**Update on Mechanisms of Hormone Action –
Focus on Metabolism, Growth and Reproductions**

Edited by Gianluca Aimaretti with Paolo Marzullo and Flavia Prodani

Published by InTech

Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia

Copyright © 2011 InTech

All chapters are Open Access distributed under the Creative Commons Attribution 3.0 license, which permits to copy, distribute, transmit, and adapt the work in any medium, so long as the original work is properly cited. After this work has been published by InTech, authors have the right to republish it, in whole or part, in any publication of which they are the author, and to make other personal use of the work. Any republication, referencing or personal use of the work must explicitly identify the original source.

As for readers, this license allows users to download, copy and build upon published chapters even for commercial purposes, as long as the author and publisher are properly credited, which ensures maximum dissemination and a wider impact of our publications.

Notice

Statements and opinions expressed in the chapters are these of the individual contributors and not necessarily those of the editors or publisher. No responsibility is accepted for the accuracy of information contained in the published chapters. The publisher assumes no responsibility for any damage or injury to persons or property arising out of the use of any materials, instructions, methods or ideas contained in the book.

Publishing Process Manager Petra Nenadic

Technical Editor Teodora Smiljanic

Cover Designer Jan Hyrat

Image Copyright 21thDesign, 2011. Used under license from Shutterstock.com

First published October, 2011

Printed in Croatia

A free online edition of this book is available at www.intechopen.com
Additional hard copies can be obtained from orders@intechweb.org

Update on Mechanisms of Hormone Action – Focus on Metabolism, Growth and Reproductions, Edited by Gianluca Aimaretti with Paolo Marzullo and Flavia Prodani
p. cm.

ISBN 978-953-307-341-5

Contents

Preface IX

Part 1 Metabolism 1

- Chapter 1 **The Gut Peptide Hormone Family, Motilin and Ghrelin 3**
Ichiro Sakata and Takafumi Sakai
- Chapter 2 **Functions of Adipose Tissue
and Adipokines in Health and Disease 15**
Francisca Lago, Rodolfo Gómez, Javier Conde,
Morena Scotece, Carlos Dieguez and Oreste Gualillo
- Chapter 3 **Glucokinase as a Glucose Sensor in Hypothalamus -
Regulation by Orexigenic and Anorexigenic Peptides 33**
Carmen Sanz, Isabel Roncero, Elvira Alvarez,
Verónica Hurtado and Enrique Blázquez
- Chapter 4 **‘Exercise-Eating Linkage’ Mediated
by Neuro-Endocrine Axis and the
Relevance in Regulation of Appetite
and Energy Balance for Prevention of Obesity 59**
Takahiro Yoshikawa
- Chapter 5 **Estrogen Receptors in Glucose Homeostasis 69**
Malin Hedengran Faulds and Karin Dahlman-Wright
- Chapter 6 **Expression of Neuropeptide Y of GIFT Tilapia
(*Oreochromis sp.*) in Yeast *Pichia Pastoris* and
Its Stimulatory Effects on Food Intake and Growth 85**
Guangzhong Wang, Caiyun Sun, Haoran Lin and Wensheng Li
- Chapter 7 **Hormones and Metabolism in Poultry 111**
Colin G. Scanes

- Chapter 8 **Metabolic Control Targets for Patients with Type 1 Diabetes in Clinical Practice** 133
María Gloria Baena-Nieto, Cristina López-Tinoco, Jose Ortego-Rojo and Manuel Aguilar-Diosdado
- Chapter 9 **Generation of Insulin Producing Cells for the Treatment of Diabetes** 157
Guo Cai Huang and Min Zhao
- Part 2 Growth and Reproduction** 173
- Chapter 10 **GH-IGF-IGFBP Axis and Metabolic Profile in Short Children Born Small for Gestational Age** 175
Daniëlle C.M. van der Kaay and Anita C.S. Hokken-Koelega
- Chapter 11 **Failure to Thrive: Overview of Diagnosis and Management** 201
Ayse Pinar Cemeroglu, Lora Kleis and Beth Robinson-Wolfe
- Chapter 12 **Hormonal Regulation of Circadian Pacemaker in Ovary and Uterus** 217
Masa-aki Hattori
- Chapter 13 **Role of Leptin in the Reproduction and Metabolism: Focus on Regulation by Seasonality in Animals** 233
Malgorzata Szczesna and Dorota A. Zieba
- Chapter 14 **Attenuin: What It Is, How It Works and What It Does** 259
Ana Gordon, José C. Garrido-Gracia, Rafaela Aguilar, Carmina Bellido, Juana Martín de las Mulas and José E. Sánchez-Criado
- Chapter 15 **Calcitonin Functions Both as a Hypocalcemic Hormone and Stimulator of Steroid Production and Oocyte Maturation in Ovarian Follicles of Common Carp, *Cyprinus carpio*** 279
Dilip Mukherjee, Sourav Kundu, Kousik Pramanick, Sudipta Paul and Buddhadev Mallick
- Chapter 16 **Ascidians: New Model Organisms for Reproductive Endocrinology** 313
Honoo Satake, Tsuyoshi Kawada, Masato Aoyama, Toshio Sekiguchi and Tsubasa Sakai
- Chapter 17 **Estrogen Receptors in Leukocytes - Possible Impact on Inflammatory Processes in the Female Reproductive System** 337
Chellakkan Selvanesan Blessen

Part 3 Gynecological Endocrinology 351

- Chapter 18 **Physiological Relevance of Pregnanolone Isomers and Their Polar Conjugates with Respect to the Gender, Menstrual Cycle and Pregnancy 353**
Martin Hill, Antonín Pařízek, Radmila Kancheva,
David Cibula, Nikolaj Madzarov and Luboslav Stárka
- Chapter 19 **Menstrual Cycle Disturbances at Reproductive Age 381**
Skatba Piotr
- Chapter 20 **Primary and Secondary Amenorrhea 427**
Valentina Chiavaroli, Ebe D'Adamo, Laura Diesse,
Tommaso de Giorgis, Francesco Chiarelli and Angelika Mohn
- Chapter 21 **The Management of Dysfunctional Uterine Bleeding 447**
Aytul Corbacioglu

Preface

The purpose of the present volume is to focus on more recent aspects of the complex regulation of hormonal action, in particular in 3 different hot fields: metabolism, growth and reproduction.

Modern approaches to the physiology and pathology of endocrine glands are based on cellular and molecular investigation of genes, peptide, hormones, protein cascade at different levels. In all of the chapters in the book all, or at least some, of these aspects are described in order to increase the endocrine knowledge.

In the first section, the chapters are focused on gastrointestinal hormones and their interactions with food intake and energy expenditure, adipose tissue function and metabolism, regulation of glucose metabolism and their clinical alterations in human and animal models.

The second section on growth and reproduction show new advances in these field with specific focus on pediatric endocrinology, with contributions on reproduction and pubertal development.

The third section is on gynecological endocrinology, related in particular on common clinical problem.

We are grateful to all contributors to this volume for sharing their in-depth insight and wisdom. These will undoubtedly make it as a successful reference for all the readers interested in endocrinology: physiology, patho-physiology, comparative and clinical aspects.

We hope that the reader of this book will be inspired by the scientific contributions from the forefront of research to further their own scientific and clinical achievements for the ultimate purpose of benefiting in their scientific work, inducing new creative ideas that will stem from reading it.

Novara, 2011

Editor: **Gianluca Aimaretti**
Co-Editors: **Paolo Marzullo** and **Flavia Prodham**
University "A. Avogadro" of the Eastern Piedmont, Novara,
Italy

Glucokinase as a Glucose Sensor in Hypothalamus - Regulation by Orexigenic and Anorexigenic Peptides

Carmen Sanz, Isabel Roncero, Elvira Alvarez,
Verónica Hurtado and Enrique Blázquez

*University Complutense of Madrid. Medical School and CIBERDEM,
Department of Cellular Biology and Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Spain*

1. Introduction

Glucose homeostasis requires hormonal and neural mechanisms in an attempt to get a normal functioning of the brain and of peripheral tissues. Blood glucose levels must be maintained within a physiological range depending of feeding and hormonal status, having the alterations of normoglycemic levels deleterious consequences. Hypothalamus plays a major role on feeding behaviour and energy homeostasis. It contains the called "satiety centre" and "hunger centre" located in ventromedial (VMH) and lateral hypothalamus (LH) respectively. These brain areas, besides others, may be altered by metabolic signals, such as changes in the electrical activity of neurons by direct application of glucose or by modifications of blood glucose levels. In this regard, glucose activates or inhibits neuronal activity, and both responses suggest the presence of glucose sensors in these brain areas.

Glucose sensors are molecular designs responsible for detecting and measuring glucose concentrations in the extracellular space. Thus, glucose sensor are presents in gut, endocrine pancreatic cells, portal vein, central nervous system and rare neuroendocrine cells, and they are responsible to avoid marked blood glucose oscillations, which permit to maintain glucose homeostasis.

First evidence of the existence of a glucose sensor system was reported in pancreatic beta-cells (Matschinsky 1990), constituted by glucokinase (GK). GK catalyses glucose phosphorylation with low affinity and it is not inhibited by its product (glucose-6-phosphate), which allows increased glucose utilization as its concentration rises. Due to GK properties, the glucose catabolism rate is proportional to glucose levels in the extracellular space and for that reason GK is the major contributor to glucose sense, since catalyses the rate-limiting step of glucose catabolism. Interestingly, glucose transporter isoform 2 (GLUT-2) also with a high K_m for glucose transport, has a different role since glucose transport occurs in both directions of the beta-cell membrane and glucose transport is 100-fold higher than the rates of glucose metabolism.

Our previous findings (Alvarez et al., 1996; Navarro et al., 1996) indicating the presence of GK together with GLUT-2 and glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) in the same cells

of hypothalamic areas implied in the control of feeding behaviour, suggest that a glucose sensor system may be present in those structures as discussed in the section 3.

GLP-1, together with others peptides, such as leptin, insulin, GLP-2, are anorexigenic peptides that acts in hypothalamic areas contributing to generate a state of satiety. By the contrary peptides orexigenic such as neuropeptide Y (NPY), orexin, galanin, ghrelin, etc, contribute to increase food intake. These effects may be the results of an accurate molecular crosstalk between the cells which secrete these peptides and the glucose sensing cells.

The importance of GK in the hypothalamic glucose sensing and its relation with anorexigenic and orexigenic peptides are discussed in this chapter.

2. Brain glucose sensor

Glucose is needed as an energy substrate but also as a signaling molecule in several processes. Glucoregulatory mechanisms are of primary functional concern to provide a continued glucose supply to the central neurons system and to face metabolic needs of peripheral tissues. Alterations of normoglycemic levels have deleterious consequences that increase the morbidity and mortality rates of the population.

In the 1950's, the glucostatic hypothesis (Mayer 1953) postulated that glucose receptors exist in the hypothalamus and possibly in other central and peripheral regions involved in the regulation of food intake. Thus, glucose balance should be tightly regulated and taking into account the pancreatic glucose sensor concept, it would be reasonable to suggest the existence of a similar system in the brain that might modulate feeding behaviour and the release of counteregulatory hormones that defend against hypoglycemia. We proposed (Alvarez et al., 1996; Navarro et al., 1996) that the hypothalamus senses plasma glucose levels in a similar fashion to beta-cells, causing changes in the expression and secretion of neuropeptides (Yang et al., 2004). Our findings indicated that GK mRNA and protein are coexpressed together with GLUT-2 in the hypothalamus of human and experimental animals, mainly in areas involved in the control of food intake such as VMH and LH (Navarro et al., 1996; Roncero et al., 2000). Taking into account these studies, it have been addressed central role of GK as glucose sensor, reinforced by GLUT-2, the K^{+}_{ATP} channel subunits SUR1 and SUR2, as well as Kir6.2, in central glucose sensing (Jordan et al., 2010).

By analogy with the beta-cell, the general idea is that the glucose metabolism and variations in ratio ATP/ADP are the keys for neural sensing of glucose. However the ATP metabolism is a general mechanism for any electrical response, while neurons produce specific electrical responses. Others authors have proposed relationship between neuronal glucose-sensing and electrical responses (Figure 1). These hypothesis include electrogenic glucose entry, the existence of specific non-transporting detectors of extracellular glucose or glucose receptors and the possibility that glial cells would be responsible of glucose changes detection.

An example of electrogenic glucose entry to neuron is the mediated by the sodium-glucose co-transporters (SGLTs), where glucose is directly coupled to Na^{+} ion movement. That entry is directly conditioned by extracellular glucose concentration. This mechanism is used in the secretion of GLP-1 by intestinal cells in response to glucose (Gribble et al., 2003) and in the excitability of glucose-response neurons of VMH and arcuate nucleus (ARC) (Yang et al., 1999) that will comment below.

Diez-Sampedro suggest the existence of a "glucose receptor" that mediates the changes in electrical activity (Diez-Sampedro et al., 2003). Thus, in some peripheral neurons, have been identified a glucose transporter protein (SGLT3/SLC5A4) that not transport glucose into the

cell, instead, this protein acted as a sensing receptor, converting elevations of extracellular glucose into Na^+ -dependent depolarization of the membrane (Figure 1).

An additional hypothesis (Pellerin & Magistretti 2004) is that astrocytes could be the primary physiological detectors of extracellular glucose changes. This model proposed that rise in extracellular glucose induce glial lactate production which is transported from glia and into the neurons by lactate transporter (MCT1) and trigger the depolarization and excitation of neurons by closing the K^+_{ATP} channels (Burdakov & Ashcroft 2002) (Figure 1).

2.1 Glucose-inhibited (GI) and glucose-excited (GE) neurons

Claude Bernard showed the earliest evidence that the brain is involved in glycemic control since the lesion of the hypothalamus in dog, induced hyperglycemia (Bernard 1849). Later, Jean Mayer (Mayer 1953) proposed that hypothalamic cells could monitor plasma glucose variations and postulated that these cells transduced variations of glucose concentrations into electrical or chemical signals that control feeding behavior. Electrophysiological studies carried out in hypothalamic slices, demonstrated the existence of neurons able to modulate their firing activity in response to changes in extracellular glucose levels (Anand et al., 1964). These are glucose-excited (GE; previously called glucose-responsive) neurons, which increase their firing rate with elevation of glucose concentrations in extracellular, or glucose-inhibited (GI; previously called glucose-sensitive) neurons, which are activated by a decrease in extracellular glucose concentration or by cellular glucoprivation (Routh 2002; Yang et al., 2004).

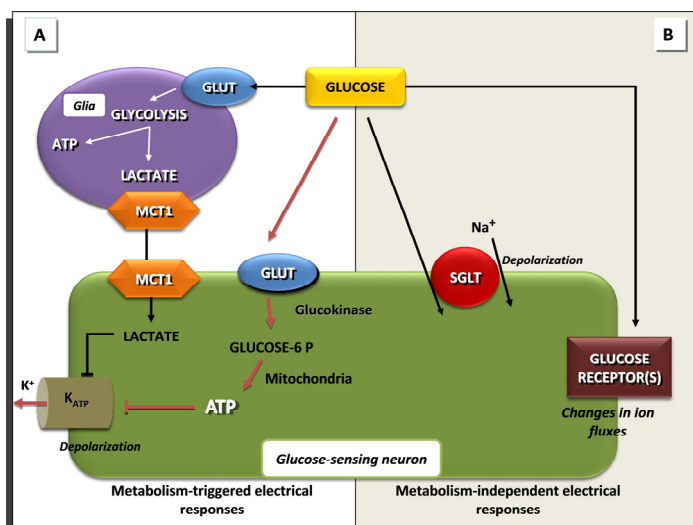


Fig. 1. Signalling pathways proposed to be involved in glucose sensing by hypothalamic neurons. A) Signalling pathways of glucose-metabolism-triggered electrical responses for neural sensing of glucose. Red lines indicate the canonical pathways share with beta-cell. Other signalling pathways could be mediated by previous glucose metabolism to lactate by glial cells. B) Pathways that trigger glucose metabolism-independent electrical responses. These pathways involve electrogenic glucose entry through sodium-glucose cotransporters (SGLT) or the presence of glucose receptors

Although both types of neurons are widely distributed in the brain, they are highly present in regions involved in the control of energy homeostasis and food intake such as hypothalamic nuclei and the brain stem (Adachi et al., 1995). Additionally it has been recently reported a novel glucose-sensing region in the medial amygdalar nucleus (Zhou et al., 2010).

The existence of glucose-regulated neurons has been studied by intravenous or intracerebroventricular injections of 2-deoxyglucose or 5-thio-glucose and posterior electrophysiological recordings or by the detection c-fos-like immunoreactivity (which is highly expressed in activated neurons). Using these approaches, responsive neurons have been found in the VMH, paraventricular (PVN) and LH, ARC, parabrachial nucleus (PBN), nucleus tractus solitarius (NTS), area postrema (AP), dorsal motor nucleus of the vagus (DMNX), and the region of the basolateral medulla (BLM) (Ritter & Dinh 1994; Dallaporta et al., 1999).

2.2 Electrophysiological pattern

Diverse signalling pathways are involved in the modulation of the electrical activity of hypothalamic neurons by glucose. On the one hand, glucose could alter neuronal electrical activity acting as energy substrate by influencing energy metabolism inside neuron and glia cells (Figure 1). On the other hand glucose could be considered as an extracellular signalling messenger that could trigger specific glucose receptors controlling the membrane ion fluxes. Other possibility could be that glucose itself can be transported by electrogenic transporters (Figure 1). Which of these general mechanisms is dominant in different glucose-sensing neurons remains to be determined.

The mechanisms regulating GE cells have been more thoroughly understood and were assumed to employ a beta-cell glucosensing strategy. Thus, glucose enters the beta-cell via GLUT-2, facilitating its diffusion down a concentration gradient. Then GK phosphorylates glucose allowing for its entry into the glycolytic pathway that leads to an increase in the ATP. The consequent increase in the cytosolic ATP/ADP concentration ratio then closes the K^+_{ATP} channels. In the beta-cell, these channels are made up of Kir6.2/SUR1 subunits (Ashcroft & Rorsman 2004). Since open K^+_{ATP} channels generate hyperpolarization of the beta-cell and so dampen its excitability, their closure results in decreasing potassium outflow and depolarization with increased electrical activity. Actually, GK are the key glucose-sensing features of this scheme because they ensure that changes in extracellular glucose levels within the physiological range are converted to proportional changes in electrical excitability. This is due to the low affinity for glucose of GK, unlike the more ubiquitously expressed hexokinase I, and that GK is not inhibited by its product, glucose-6-phosphate.

The functional importance of GK in GE neurons was studied by pharmacological inhibition which decreased neuronal activity. *In vitro* studies on primary VMH cultures have shown that selective downregulation of GK leads to selective loss of glucose sensing and a decrease in cellular ATP concentration corresponding with an increase in K^+_{ATP} channel activation (Dunn-Meynell et al., 2002; Kang et al., 2006). This supports the model that inhibition of GK, in at least a proportion of GE neurons, reduces ATP production causing K^+_{ATP} channel opening and cell hyperpolarization. Recent findings indicate that although elements of canonical model used in beta-cell, are functional in some hypothalamic cells, this pathway is not universally essential for excitation of glucose-sensing neurons by glucose. In rats and

humans, the expression of GLUT-2, GK (Navarro et al., 1996; Roncero et al., 2000) and Kir6.2 was found in some but not all GE neurons (Kang et al., 2004) and were also present in non-glucose-sensing neurons (Lynch et al., 2000). For example, glucose-induced excitation of ARC neurons was recently reported in mice lacking Kir6.2, and no significant increases in cytosolic ATP levels could be detected in hypothalamic neurons after changes in extracellular glucose. Thus, the molecular support for the idea that all GE neurons rely on the beta-cell tools to sense glucose is currently inconclusive and possible alternative glucose-sensing strategies could include electrogenic glucose entry, glucose-induced release of glial lactate, and extracellular glucose receptors (Pellerin & Magistretti 2004; Burdakov et al., 2005).

Much less is known about GI neurons and whether these neurons follow the same glucose sensing strategy remains unclear (Burdakov & Lesage 2010). It has been proposed to involve reduction in the depolarizing activity of the Na⁺/K⁺ pump, or activation of a hyperpolarizing Cl⁻ current. Although it has been suggested that the metabolic model of glucose sensing applies to GI neurons, there is convincing evidence for metabolism-independent neuronal glucose sensing in GI neurons. As it has been mentioned, Kang group's (Kang et al., 2004) showed that some but not all glucose sensing neurons of the VMN express GK and SUR1, suggesting that other regulatory mechanisms must control glucose sensing in some of these neurons. Furthermore, Gonzalez et al (Gonzalez et al., 2009), used direct electrophysiological measurements of glucose sensing orexin neurons to show that metabolism independent glucose sensing exists in GI neurons. They found that GK inhibitors do not block glucose sensing in these neurons. However, despite the evidence for metabolism-independent as well as dependent glucose sensing mechanisms, the nature of the glucose sensing machinery in GI neurons remains unclear.

2.3 Hypothalamic distribution of GE and GI neurons

Hypothalamic glucose-sensing neurons comprise subgroups of cells in PVN, LH, ARC, VMH hypothalamic regions, and can be either electrically inhibited or excited by elevations in extracellular glucose (Anand et al., 1964; Oomura et al., 1969; Routh 2002; Wang et al., 2004). The distribution of GE glucose response neurons in the hypothalamus are confined mostly to the VMH, ARC, and PVN (Dunn-Meynell et al., 1998; Silver & Erecinska 1998; Wang et al., 2004). However, GI neurons are found mainly in the LH (Oomura et al., 1974), median ARC, and PVN.

There are two major subpopulations of neurons in the ARC of the hypothalamus implicated in the control of feeding. One population contains pro-opiomelanocortin (POMC) and α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) that are anorexigenic peptides and inhibits food intake. The second population of neurons contains agouti-related protein (AgRP) and neuropeptide Y (NPY) orexigenic peptides that stimulate food intake (Cone et al., 2001). GI neurons are present in the VMN in the ARC and in the LH and partly overlap with the orexigenic NPY/AgRP and possibly orexin neurons. GE neurons correspond in part to POMC neurons in the VMN and possibly in the ARC and POMC neurons in the LH (Mountjoy & Rutter 2007).

2.4 Effect of glucose concentrations on the brain glucose sensors

Some of the glucose-sensing neurons in the LH, ARC and VMH hypothalamic regions electrically respond to changes in glucose within the physiological ranges of glucose (Wang et al., 2004; Burdakov et al., 2005; Song & Routh 2005). As a general rule, the extracellular

concentration of glucose in the brain is 10–30% of that in the blood (Silver & Erecinska 1998). During euglycemia, brain glucose levels are 0.7–2.5 mM, and may be reached 5mM under severe plasma hyperglycemia. On the other hand, plasma hypoglycaemia can cause the brain glucose to fall to 0.2–0.5 mM. Changes in plasma glucose corresponding to meal-to-meal fluctuation (about 5–8mM) (Silver & Erecinska 1994) lead to changes in glucose concentration in the brain that it is expected to be in the range between 1 and 2.5mM (Routh 2002). It is also noteworthy that glucose-sensing neurons located near regions with a reduced blood–brain barrier for example, the median eminence region that neighbors the hypothalamic ARC (Elmqvist et al., 1999), may be exposed to a much higher glucose concentrations than other brain cells, even approaching those present in the plasma. If this is the case, for glucose-sensing neurons of the ARC, high glucose concentrations (greater than 5 mM) may well comprise a physiologically relevant stimulus (Fioramonti et al., 2004) . In this way, it has been described in the ARC, the presence of GE and GI neurons responsive to glucose over either a low (0–5 mM) or a high glucose concentration range (5–20 mM); the latter are referred to as high GE (HGE) or high GI (HGI) neurons, respectively (Fioramonti et al., 2004; Penicaud et al., 2006).

More details about the effect of glucose oscillations in the glucose sensor GK will be discussed in the section 4 of this chapter.

3. Glucokinase as part of a hypothalamic glucose sensor system

GK is a member of the hexokinase family (ATP:D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1) that catalyses the phosphorylation of glucose to glucose 6-phosphate. Hexokinases I, II and III have a high affinity for glucose, with low K_m (Michaelis constant) values in the micromolar range. GK or hexokinase type IV has a low affinity for glucose; it is not inhibited by physiological concentrations of glucose 6-phosphate, and has a molecular mass of about 50 kDa (Iynedjian 1993)

For years, the liver and the pancreatic islets were considered to be the only tissues in which GK activity could be detected. Later on, GK mRNAs of appropriate sizes were found in the corticotroph anterior pituitary cell line AtT-20, in rat pituitaries (Hughes et al., 1991) and in brain and intestine of the rat, but no enzyme activity was reported in neither (Jetton et al., 1994; Alvarez et al., 1996; Navarro et al., 1996). However, Roncero et al 2000 described that GK gene expression in rat brain gave rise to a protein of 52 kDa, with a high K_m phosphorylating activity. Brain GK showed kinetic properties similar to those previously reported for the enzyme of hepatic or pancreatic islet origin. It has a high apparent K_m for glucose (8.9–15 mM) and displays no product inhibition by glucose 6-phosphate. The contribution of GK to the total glucose phosphorylating activity was 40–19% in different cerebral regions, measured with a radiometric assay, and of 25–14% as determined by a spectrophotometric method.

The presence of tissue-specific promoters in the GK gen allows differential regulation. The upstream promoter, now rightly called neuro-endocrine promoter to distinguish it from the hepatic promoter (Iynedjian et al., 1996; Levin et al., 2004), is functional in beta-cells and in the brain (Magnuson & Shelton 1989; Roncero et al., 2000), while the downstream promoter is used only in liver . GK levels in beta-cells appear to be controlled by glucose, probably through a post-transcriptional mechanism (Iynedjian 1993; Matschinsky et al., 1993). In contrast, the liver-specific promoter is mainly affected by insulin and glucagon, which explains the extraordinary transcriptional regulation by the nutritional state (Iynedjian 1993).

The short-term regulation of GK activity involves several mechanisms: Long-chain fatty acyl-CoAs have been shown to be allosteric competitive inhibitors *in vitro* of the liver enzyme (Tippett & Neet 1982) and human beta-cell GK (Moukil et al., 2000). Glucose regulates the activity of GK through a “mnemonic” mechanism, which increases the activity of liver GK in the presence of high levels of glucose and decreases it when the glucose level is low (Cornish-Bowden & Storer 1986). GK activity in the liver is also regulated by the GK regulatory protein (GKRP), which behaves as a competitive inhibitor of GK. In the presence of fructose 6-phosphate GKRP binds to GK and inhibits its activity, whereas fructose 1-phosphate prevents the formation of the complex GKRP-GK (Van Schaftingen 1989). GKRP is not only a protein that binds and inactivates GK, but also regulates the translocation of GK between the cytoplasm and the nucleus. When glycogenolysis and/or gluconeogenesis are activated, the concentration of fructose 6-phosphate increases in the liver and produces the inhibition of GK, which facilitates the release of glucose by the liver. When carbohydrates are present in the diet, fructose is phosphorylated to fructose-1 phosphate, which favours glucose utilization by the liver (Agius & Peak 1993; Toyoda et al., 1995; Shiota et al., 1999). Thus, in the liver, the subcellular translocation of GK regulates the enzyme activity in accordance with the metabolic needs of the cells. It is therefore accepted that translocation of GK to the nucleus at low glucose concentrations needs GKRP as an anchoring protein that allows transport through the nuclear pore complex. However, it is unclear whether the nuclear export of GK requires GKRP. In pancreatic islets, GK activity may also be regulated by a protein, in a similar way to that described in hepatocytes (Malaisse et al., 1990).

Subsequent research has also identified several GK binding proteins that could act as cytoplasmic binding proteins. They include a dual-specificity protein phosphatase, the glucokinase-associated phosphatase (Munoz-Alonso et al., 2000), and the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (Baltrusch et al., 2001). Other studies indicate that a minor fraction of GK and GKRP may be integrated in a multienzyme complex, including the pro-apoptotic protein BAD, and become associates with mitochondria in hepatocytes (Arden et al., 2006). These data suggest the existence of different pools of cytoplasmic GK with specialized metabolic functions (Arden et al., 2006). It has also been reported that AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibits GK translocation from the nucleus.

In pancreatic beta-cells GK is considered to be a true glucose sensor (Matschinsky 1990) involved in glucose-dependent insulin release. The GK glucose sensor concept is supported by the fact that GK mutations are responsible for some types of maturity-onset diabetes of the young-2 (MODY-2) (Vionnet et al., 1992) and for persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia in infancy (PHHI) (Christesen et al., 2002). In addition, as noted above, targeted disruption of the GK gene in the beta-cells of mice produces severe alterations in insulin release (Grupe et al., 1995).

3.1 Expression, activity and localization of hypothalamic GK and glucokinase regulatory protein (GKRP) in the hypothalamus

Several brain areas, such as the LH and VMH and the dorsomedial medulla oblongata, including the NTS and the motor nucleus of the vagus, modulate glucose homeostasis in the liver and pancreas (Oomura & Yoshimatsu 1984). As previously cited, glucose is mainly excitatory in the VMH and inhibitory in the LH and NTS (Oomura & Yoshimatsu 1984), suggesting the presence of glucose sensors in neurons of these brain areas. Indeed, stimulation of glucoreceptors present in the neurons of the VMH, promotes the release of

the counter-regulatory hormones, catecholamines and glucagon, which defend the organism against glucopenia (Borg et al., 1995).

Our findings, indicate that GLUT-2, GK and GLP-1R are expressed in the same cells of the rat and human hypothalamus (Alvarez et al., 1996) (Figure 2), and are located in areas involved in the regulation of energy homeostasis, feeding behaviour and glucose metabolism. It is noteworthy that in the brain, GLP-1 contributes to reducing food intake (Navarro et al., 1996; Turton et al., 1996), and the co-localization of those three components in hypothalamic neurons suggests that a glucose sensor system may be involved in the transduction of signals required to produce a state of satiety.

As we previously cited, GK activity may also be regulated by GKRP, acting in accordance with the metabolic needs of the cells (Van Schaftingen et al., 1984; Shiotani et al., 1999; Roncero et al., 2004). Interestingly, we reported the coexpression of GK and GKRP in both rat and human brains (Roncero et al., 2000; Alvarez et al., 2002; Roncero et al., 2004), as well as GKRP interacting with GK in the presence of fructose-6-phosphate, which suggests that both are active and both may participate in the glucosensing process in the central nervous system (Alvarez et al., 2002).

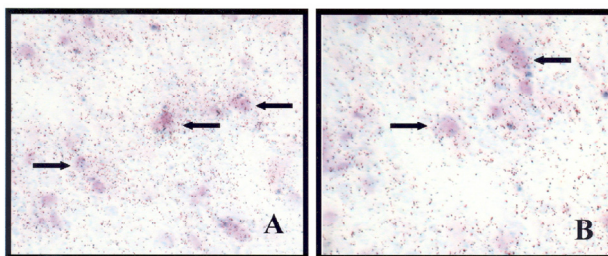


Fig. 2. In situ hybridization histochemistry of GLP-1R and GLUT-2 or GK mRNAs. **A** double-labeling of GLP-1R and GLUT-2 mRNAs in the VMH. **B** Double-labeling of GLP-1R and GK mRNAs in the VMH. Silver grains indicate the localization of either GLUT-2 or GK mRNAs. Blue reaction product indicates labelling of GLP-1R mRNAs. (Microphotographs sumministrated by Dr. J. Chowen)

GK and GKRP have been found in foetal pancreas and liver (Vandercammen & Van Schaftingen 1993; Garcia-Flores et al., 2002). Also in foetal hypothalamus GK mRNA was present in day 18 of development (Sutherland et al., 2005). Our result concluded that GK and GKRP were functionally active before birth in the rat brain. Both proteins colocalised in the same cells of hypothalamus and the cerebral cortex of 21-day-old fetuses (F-21) (Roncero et al., 2009) (Figure 3).

The presence of GK mRNA was confirmed in approximately 50% of GE and GI neurons in the VMH. Some of these neurons also contained mRNAs for subunits of K^{+}_{ATP} channels (Kang et al., 2004). The use of specific small interfering RNA (siRNA) to knock-down GK in primary cultures of neurons from the rat VMH, abolished the responses to glucose (Kang et al., 2006). Together, these findings supported the idea that GK was the glucose sensor of at least a fraction of VMH neurons, functioning as the rate determining enzyme of glucose metabolism and controlling neuronal excitability. In the VMH, GK mRNA was shown to be expressed in neurons synthesizing POMC and NPY/AgRP, which play critical roles in neural pathways involved in the regulation of food intake and energy expenditure.

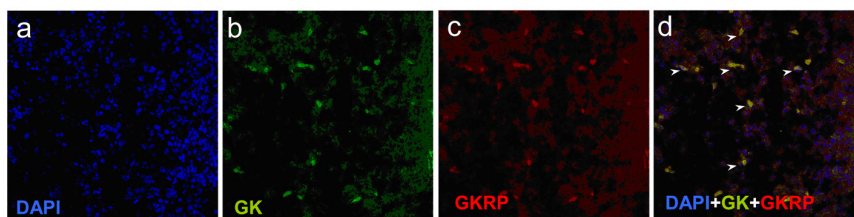


Fig. 3. GK and GKRPs detection in the hypothalamus. Immunofluorescent detection of GK (green b) or GKRPs (red c) proteins in VMH from twenty-one-day old foetuses. Nuclear staining (a) was carried out in blue with 4,6-diamid-o-2-phenylindole (DAPI). The arrows (d) indicate the double positive cells for GK and GKRPs.

4. Regulation of hypothalamic GK by glucose or regulatory peptides

The glucose-sensing neurons have receptors for orexigenic and anorexigenic neuropeptides that may modulate feeding behaviour through a glucose sensor system (Schuit et al., 2001).

The effects of orexigenic and anorexigenic peptides and glucose on GK gene expression were tested (Sanz et al., 2007) in GT1-7 immortalized hypothalamic neurons, which are glucose-sensing cells (Lee et al., 2005) able to respond to glucose deprivation or high-glucose levels, as well as having intrinsic GK activity. Neither the promoter activity of the GK gene in transfected GT1-7 cells nor the endogenous GK gene expression were modified by the action of different concentrations of glucose or GLP-1, leptin, or NPY in the extracellular space. However, GK enzyme activities were modified by these peptides.

Using hypothalamic slices in culture, instead cell line, which it is a better physiological model, the effect of glucose orexigenic and anorexigenic peptides on GK activities in VMH and LH areas were assayed. In the VMH there was a tendency for GK activities to increase as glucose rose in the extracellular media and high-GK activity was found at lower glucose concentrations in the LH. These findings could reflect a different type of behavior for the GE and GI neurons located in the VMH and the LH, when challenged by different concentrations of glucose. This would be in agreement with the tendency of GK activity to increase with rises in glucose in the range of 0.5–20 mM that was reported in the VMH (Sanz et al., 2007), while neurons in LH were not excited by the higher concentrations of glucose but by lower concentrations of this hexose, as happens with GK activities (Sanz et al., 2007). The observed changes in GK activity in response to glucose in certain hypothalamic areas suggest that such activity would not only be tissue-specific but also even cell-specific in defined brain areas. Interestingly, GK activities were thus significantly lower in LH than in VMH at high glucose concentrations, but this effect was reversed by the presence of insulin. This distinctive response observed in LH at high glucose may be related to different functional activities of these two areas, rather than to other kind of effects. The data obtained in these studies indicate a different response to glucose levels in the VMH and LH and also that some orexigenic and anorexigenic peptides might modulate GK activities in neurons of these areas. Additionally, it suggests that in most of the cases modifications of hypothalamic GK occur at the enzyme activity level rather than in transcriptional expression.

5. Role of hypothalamic GK on the control of feeding behaviour and body weight

Coexpression of GLUT-2, GK and GKRP in areas involved in feeding behaviour (Roncero et al., 2000; Roncero et al., 2004) might play a role in glucose sensing, in which GK and GKRP made possible a real sensor activity. Furthermore the effects of anorexigenic and orexigenic peptides through its receptors in this system should facilitate the transduction of signals required to produce a state of satiety. In fact, we have reported experimental evidences that GLP-1 is an anorexigenic peptide and controls the glucose metabolism in the human hypothalamus areas involved in the regulation of feeding behaviour (Alvarez et al., 2005) (Navarro et al., 1996).

5.1 Anorexigenic and orexigenic peptides

Early suggestions that hypothalamus plays a major role on feeding behaviour and energy homeostasis were obtained after brain lesion and stimulation studies. Remembering these observations, such as electrical stimulation of VMH suppress food intake and that bilateral lesions of these structures induce hyperphagia and obesity, VMH was named as the satiety centre, while alterations of LH induced the opposite set of responses and thus was called the hunger centre. Also, the dorsomedial medulla oblongata, including the NTS and the motor nucleus of the vagus, are implied in these processes. Now, we know the existence of specific subpopulations of neurons involved in energy homeostasis that are included in neuronal pathways with anorexigenic and orexigenic biomolecules (table 1), that generate integrated responses to afferent stimuli related to modifications in metabolites or in fuels storage.

The VMH is the responsible for integrating peripheral signals of nutrient status and adiposity. For example, the ARC contains neurons secreting the NPY and POMC. These neuropeptides have opposite effects on energy homeostasis, since NPY increases food intake and inhibit energy expenditure, while POMC exerts the contrary effects (Adage et al., 2001). Other studies suggest that some VMH neurons are GABAergic, although there is not a clear relationship to glucose-sensing capacity. More recent findings show that most VMH neurons express the protein steroidogenic factor-1 (SF-1) and that SF-1-positives neurons have key roles in glucose homeostasis (Tong et al., 2007; Tsuneki et al., 2010). The LH cells contain the peptides orexins/hypocretins, which are not expressed anywhere else in the brain (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Lack of orexin/hypocretin produces hypophagia and late onset obesity among others effects (Hara et al., 2001).

A number of peptidic hormones, previously thought to be specific to the gastroenteropancreatic system and later found also in the mammalian brain, have been shown to modulate appetite, energy, and body weight. They play these physiological effects together with other biomolecules such as NPY, opioid peptides, galanin, vasopressin, and GHRH (Bray 1992). Thus, feeding behaviour is controlled by the antagonist effects of anorexigenic and orexigenic biomolecules. The complex mechanisms underlying the abundance of such variety of feeding behaviour-modulating substances can be understood on the basis of, the specific role for each molecule as a regulatory mechanism in energy balance status, the specificity of macronutrient intake (carbohydrate, fat or proteins) and meal size control, and the shifts in feeding behaviour related to hormonal status, gender, age, and circadian rhythms (Leibowitz 1992).

It is accepted that cells of several hypothalamic nuclei detect circulating satiety signals and transmit this information to other brain areas. Anorexigenic and orexigenic biomolecules are

located in VMH, LH, PVN and ARC interacting one to others in a way that they may induce a characteristic feeding behaviour. Thus, peptide Y (Y3-36) is released from gastrointestinal tract postprandially, and acts on NPY Y₂ receptor in the ARC to inhibit feeding with a “long-term” effect (Batterham et al., 2002). On the contrary, other satiety signals induced by gut-brain peptides such as GLP-1, GLP-2 and CCK produced (Navarro et al., 1996; Turton et al., 1996; Rodriguez de Fonseca et al., 2000; Tang-Christensen et al., 2000) a “short-term” effect, while insulin and leptin (Batterham et al., 2002) inhibit the appetite by increasing the formation of POMC and reducing NPY action. In addition, ghrelin a peptide released by the stomach is stimulated before the meals to facilitate NPY action (Coiro et al., 2006).

ANOREXIGENIC		OREXIGENIC
CART	Leptin	AGRP
CCK	α -MSH	Galanin
CRH	Neurotensin	Ghrelin
GLP-1	Oxytocin	MCH
GHRH	Pro-opiomelanocortin	Noradrenaline
GLP-2	Peptide Y (Y 3-36)	NPY
IL-1 β	TRH	Opioid peptides
Insulin	Serotonin	Orexin A and B
	Urocortin	

Table 1. Anorexigenic and orexigenic biomolecules implied in the control of feeding behaviour.

Intracerebroventricular or subcutaneous administration of GLP-1 produced a marked reduction of food intake and water ingestion. Exendin-4, proved to be a potent agonist of GLP-1R also decreased both food and water intake in a dose-dependent manner, while exendin (9-39) considered as an antagonist of the GLP-1R, reversed the inhibitory effects of GLP-1 or exendin-4 (Navarro et al., 1996; Turton et al., 1996; Rodriguez de Fonseca et al., 2000). Additionally, icv administration of GLP-1 to mice and rats produced a marked decrease of food intake but not of water ingestion. Surprisingly, this effect was avoided by the administration of exendin (9-39) (Tang-Christensen et al., 2000) .

5.2 Hypothalamic slices as a physiological model for the study of hypothalamic regulation by glucose and peptides

Some hypothalamic neuronal cell models have been generated from embryonic and adult animals to carry out molecular genetic analysis of hypothalamic neuronal function. Some examples are the GT1-7 and N1E-115 cell lines or the recently hypothalamic neuronal cell models generated by Belsham's group (Dalvi et al., 2011). However, the use of organotypic slice cultures is an approach with many advantages. A broad range of studies shows that organotypic cultures retain many in vivo characteristics as regards, neuronal morphology, cellular and anatomical relations and network connections (Sundstrom et al., 2005). The advantages of the slices culture are the isolated and well defined environment of the in vitro preparations and in this way several brain areas have been studied (hippocampus, cerebellum, cortex, striatum, brain stem structures, spinal cord, retina and hypothalamus).

For these reasons, these cultures are increasingly been used as models to investigate mechanisms and treatment strategies for neurodegenerative disorders or exposure to neurotoxic compounds (Kristensen et al., 2003), traumatic brain injury (TBI) (Morrison et al., 2006) and neurogenesis (Lossi et al., 2009). Hypothalamic slices have also been frequently used for electrophysiological studies developed *in vitro* to evaluate the firing rate of specific neurons located in VMH and LH (Yang et al., 1999)

Most hypothalamic organotypic slice cultures have been derived from neonatal animals. In fact, slices of developing brain tissue can be grown for several weeks as so called organotypic slice cultures (Norberg et al., 2005), but also adult rats have been used. In this sense our group have used short-term hypothalamic slices cultures, obtained from adult rat, to test the effect of different peptides on the gene expression and enzymatic activity in the VMH and LH areas (Sanz et al., 2007; Sanz et al., 2008). Thus, the hypothalamic organotypic cultures are a useful model for the study of the physiological effect of some peptides on specific hypothalamic nuclei, which could be dissected after the treatment and analyzed by enzymatic, molecular, biochemical or histological procedures.

5.3 Interactions between anorexigenic peptides and cerebral glucose metabolism in humans

By previous studies we know that GLP-1 is an anorexigenic peptide. The proglucagon gene is expressed mainly in the brainstem and hypothalamus, through a mRNA transcript identical to that produced in pancreas and intestine (Drucker & Asa 1988), which permits the formation of glucagon-related peptides in the brain. Furthermore, the hypothalamus and brainstem are the areas with the highest concentration of GLP-1 and its receptors (Uttenthal et al., 1992), suggesting that this peptide has a local function, as well as a more remote signalling role. The expression of GLP-1R gene gives rise to a protein with effects on the selective release of neurotransmitters (Mora et al., 1992), appetite and fluid homeostasis, as well as serves as a signal to reduce food intake (Navarro et al., 1996; Turton et al., 1996; Rodriguez de Fonseca et al., 2000). Also, the coexpression of GLP-1R with those of GLUT-2 and GK in the same cells suggest that these proteins play a role in glucose sensing (Navarro et al., 1996). A further step was to evaluate the GLP-1 effect on cerebral-glucose metabolism in control subjects by positron emission tomography (PET), using 2-F-18 deoxy-D-glucose (FDG). PET is an imaging technology in which compounds labelled with positron-emitting radioisotopes serve as molecular probes to identify and determine biochemical processes *in vivo*.

We used (Alvarez et al., 2005) intravenously injected FDG to trace the transport and phosphorylation of glucose in brain. FDG-6-phosphate is the end product of the process of glucose metabolism and it is not a substrate for subsequent metabolic reactions then it is retained in the cell proportionately to the rate of glycolysis. The activity measured reflects FDG transport and phosphorylation by the cells and, in the case of the hypothalamus and brainstem which contains cells expressing GLUT-2 and GK, may provide some information about brain glucose sensing.

PET imaging was sensitive to GLP-1 administration (Figure 4). Thus, this peptide significantly reduced cerebral glucose metabolism in the hypothalamus and brainstem as compared with the data obtained in normal control subjects without GLP-1 administration. These changes can be explained in terms of this peptide can enter the brain by binding to blood barrier-free organs such as the subfornical organ and the area postrema (Orskov et al., 1996). Also, it could be transported into the brain through the choroid plexus, which has a high density of GLP-1 receptors.

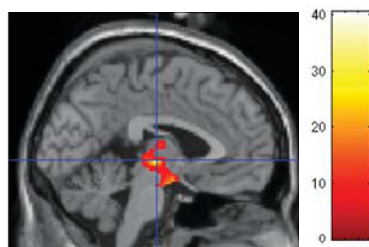


Fig. 4. PET of glucose metabolism in brains of human controls subjects, i.v. perfused with or without GLP-1 (0.75 pmol/Kg body weight for 30 minutes). The differences between both tests were of 6 months, and were projected on sagittal normalized brain MRI. PET imaging was sensitive to the peptide administration. Thus GLP-1 significantly reduced ($p < 0.001$) cerebral glucose metabolism in the hypothalamus and brainstem as compared with the data obtained in normal control subjects without peptide administration.

Using PET technology we observed that iv administration of GLP-1 produced a significant reduction in carbohydrate metabolism in selective areas of the brain, including the hypothalamus and brainstem, both areas involved in feeding behaviour. Thus, the accumulation of FDG-6-phosphate into the cells serves to assess the facilitated transport and hexokinase phosphorylation of glucose, which, in the case of hypothalamus and brainstem cells containing GLUT-2 and GK, might facilitate the glucose-sensing process. These findings are of interest because glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose have been found in the medulla oblongata and mesencephalon of the rat (Ritter et al., 2000), in addition to those reported in the hypothalamus. Also, GLP-1 is expressed in human brain, and it most likely mediates the effect of GLP-1 on glucose metabolism in selective areas of hypothalamus and brainstem; it may also facilitate the process of glucose sensing in these areas. Because the reduced number of neurons involved in glucose sensing (Oomura et al., 1969; Ashford et al., 1990), approximately 40% of cells in the VMH and 30% of cells in the LH, PET imaging offers a good procedure for identifying these cell signals in vivo more accurately compared with the more commonly used in vitro procedures.

These findings provide first evidences of the action of an anorexigenic peptide on glucose metabolism in the hypothalamus and brainstem, and might explain the satiety-induced effects of peripheral or central administration of GLP-1 and the central alterations produced by the iv administration of the peptide. Furthermore, open new doors for studying the effects of other regulatory peptides in subjects under control and pathophysiological situations.

6. Others hypothalamic metabolic sensors: AMPK structure and regulation

AMP-activated protein kinase (AMPK) functions as a cellular energy sensor being activated during energy depletion. The kinase is mainly activated by an increase AMP/ATP ratio. Activation of AMPK regulates a large number of downstream targets stimulating ATP-generating, catabolic pathways and inhibiting anabolic pathways (Hardie et al., 1998; Rutter et al., 2003).

AMPK is a heterotrimeric serine/threonine kinase consisting of a catalytic α -subunit encoded by 2 genes ($\alpha 1$ or $\alpha 2$), a β -subunit encoded by 2 genes ($\beta 1$, $\beta 2$) and a regulatory γ -subunit encoded by 3 genes ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$). Different isoforms and alternative splicing of some

mRNAs encoding these subunits, give rise to large variety of heterotrimeric combinations (Hardie 2007; Viollet et al., 2009). It is known that some tissues can express several types of AMPK complexes.

AMPK can be regulated by an allosteric mechanism, through AMP binding to γ subunit, and by covalent phosphorylation at Thr¹⁷² located in the kinase domain of the α -subunit. The level of phosphorylation is also regulated by AMP through stimulation of upstream kinases and by inhibition of dephosphorylation by protein phosphatases. One of the identified upstream kinases of AMPK is the tumor-suppressor (Liver Kinase B1: LKB1). In neural and endothelial cells AMPK may be also activated by rises in cytosolic Ca²⁺ concentration. The calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) can also activate AMPK by phosphorylation of Thr¹⁷².

The AMPK is able to detect changes in cellular energy state that occur in response to variations in nutrient concentrations. Any cellular or metabolic stress that reduces ATP production or accelerates ATP consumption will increase the ratio of the ADP/ATP, which will be amplified by the action of adenylate kinase resulting in increased AMP/ATP with consequent activation of AMPK. Once activated, AMPK first directly affects the activity of key enzymes of glucose metabolism and fatty acids and at a second more long term regulates transcriptional control of the main elements involved in these metabolic pathways. The net result of the activation of AMPK will restore energy balance inhibiting anabolic pathways responsible for the synthesis of macromolecules. (Figure 5)

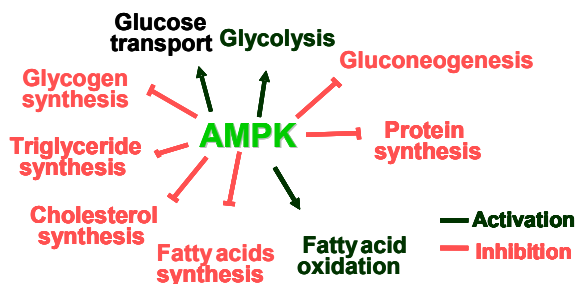


Fig. 5. AMPK regulation of downstream metabolic events. AMPK restores energy balance by activation of processes that produce energy and inhibition of those that consume energy.

6.1 Role of AMPK in hypothalamic glucose sensing

AMPK is broadly expressed throughout the brain with a mainly neuronal distribution (Turnley et al., 1999). Hypothalamic AMPK has been proposed to play a role in the central regulation of food intake and energy balance. In this way, fasting increases and re-feeding decreases AMPK activity in various hypothalamic nuclei (Minokoshi et al., 2004). Several studies have demonstrated that hypothalamic AMPK is regulated by blood glucose levels. Peripheral or central hyperglycaemia inhibits AMPK in several hypothalamic nuclei. Insulin-induced hypoglycaemia and inhibition of intracellular glucose utilization through the administration of 2-deoxyglucose both increased hypothalamic AMPK activity and food intake.

The use of catalytic subunit of AMPK knockout mice (AMPK α 1^{-/-} and AMPK α 2^{-/-}) indicated that AMPK α 1^{-/-} mice has no metabolic alterations, whereas AMPK α 2^{-/-} mice showed insulin-resistance characterized by impaired insulin stimulated whole-body glucose

utilization and skeletal muscle glycogen synthesis and reduced insulin secretion. However, they showed no apparent changes in body weight and food intake (Viollet et al., 2009).

In the last years AMPK has been proposed as a cellular energy sensor that is able to assemble many regulatory signals and nutritional environmental changes, also involved in maintaining whole body energy balance (Hardie et al., 2006). Regulation of AMPK activity in hypothalamic areas involved in the control of feeding behaviours have been also described as a mechanism to detect nutritional variations including glucose levels (Mountjoy & Rutter 2007). Neurons implied in the control of food intake have as well glucose sensor that respond to fluctuations in extracellular glucose levels.

In general most cells will express glucose transporters that have high affinity for glucose; therefore ATP synthesis by glucose metabolism only stops when glucose levels are pathologically low. However, cells that have a glucose sensor mechanism, express GLUT-2 and GK. The presence of these proteins of high K_m for transport and metabolism of glucose will allow that ATP synthesis decreases when decreases the concentration of glucose in the physiological range and this allows that in these cells the AMPK can be activated by low levels of glucose and inhibited by high glucose levels in the physiological range.

The hypothalamic AMPK role has been studied *in vivo* by expression of AMPK mutants: Inhibition of hypothalamic AMPK suppresses neuronal NPY/AgRP signalling and inhibit food intake. However, elevated AMPK increases NPY/AgRP expression, food intake and body weight (Minokoshi et al., 2004).

The role of AMPK in the two major subpopulations of neurons involved in the regulation of feeding was later analyzed by knock out of AMPK α 2 in specific neurons of mice. The results showed that genetic deletion of AMPK α 2 in hypothalamic POMC neurons (POMC AMPK α 2-KO) developed obesity. However, AMPK α 2 specifically knocked in AgRP neurones (AgRP AMPK α 2-KO) exhibited an age-related lean phenotype (Claret et al., 2007). Those mice do not respond to changes in extracellular glucose. The unexpected results suggest that absence of AMPK in orexigenic AgRP neurons reduced body weight, whereas lack of AMPK in anorexigenic POMC neurons increased body weight. These results suggest a role for AMPK as a common glucose-sensor in these neurons (Claret et al., 2007). It is important to emphasize that GE neurons do not overlap completely with POMC neurons in the ARC while the GI neurons do not completely overlap with NPY/AgRP neurons. Those findings indicated the complexity of the functions of hypothalamic AMPK.

6.2 Regulation by orexigenic and anorexigenic peptides

Several reports indicate that AMPK is also regulated by several orexigenic and anorexigenic signals (Minokoshi et al., 2004). Thus, hypothalamic AMPK activity was inhibited in ARC and PVN by anorexigenic peptides as leptin and insulin by contrast, orexigenic peptides (ghrelin) increased specifically α 2AMPK activity

In other hand, other studies reported AMPK-independent pathways. The effect of leptin were maintained in POMC α 2AMPK-KO neurons and insulin depolarised AgRP neurons in AgRP α 2AMPK-KO (Claret et al., 2007). The different results may be explained, in addition to the different techniques and experimental setups, by the presence of distinct subpopulations of GE and GI neurons with different neuropeptide phenotypes, responses to hormonal stimuli and, in some cases, different glucose-sensing mechanisms.

The downstream pathways of AMPK in the hypothalamus may involve the acetyl-CoA carboxylase (ACC)-malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) pathway and the

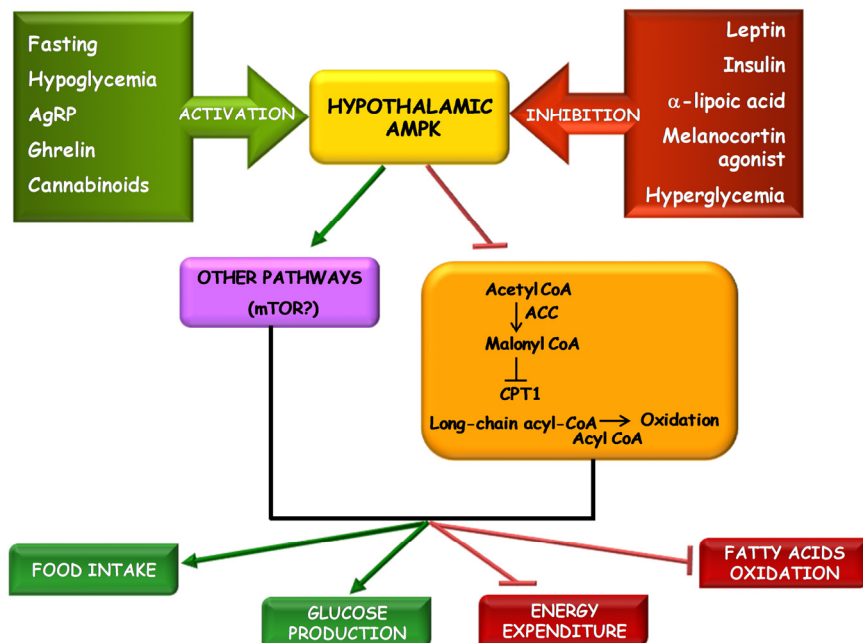


Fig. 6. Regulation of hypothalamic AMPK activity. Downstream targets involved in this signaling pathway. Several orexigenic and anorexigenic peptides regulate AMPK activity. Some of downstream targets of AMPK in the hypothalamus: ACC, acetyl-CoA carboxylase; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1. The effect of AMPK on the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway has not been directly proved in the hypothalamus.

mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. Activation of ACC, as a consequence of AMPK inhibition, would lead to increased intracellular malonyl-CoA levels, which would inhibit mitochondrial CPT1 and fatty acid oxidation.

The mTOR is another possible target of AMPK (Figure 6). AMPK inhibits mTOR signalling, thereby suppressing protein synthesis, which is an important pathway by which AMPK conserves cellular energy. The mTOR signalling pathway plays a crucial role in the regulation of food intake and body weight in the hypothalamus (Cota et al., 2006; Ropelle et al., 2008). The mTOR is colocalized with AgRP/NPY and POMC neurons in the ARC (Perrin et al., 2004). Fasting downregulates mTOR signalling, whereas re-feeding activates it.

Interestingly, hypothalamic AMPK also mediates the counter-regulatory response to hypoglycaemia, increasing the release of peripheral hormones such as corticosterone, catecholamines and glucagon (Han et al., 2005; McCrimmon et al., 2006). Thus AMPK is not only a peripheral or a central mediator, but also a key enzyme in coordinating the interaction between peripheral and central energy regulation.

It is generally accepted that in peripheral organs, fuel overabundance alters the activity of metabolic sensors (decreased AMPK and increased the mTOR and its down-stream target the S6Kinase (p70S6K)) causing insulin resistance (Kola et al., 2005).

AMPK and mTOR activity respond to changes in glucose and other nutrients in hypothalamic centres involved in control of feeding and deregulation of this signalling pathways might be

implied in the develop of obesity and diabetes type 2. GLP-1 treatment to type 2 diabetic subjects normalizes fasting levels of blood glucose and decreases glucose levels after ingestion of a meal (Niswender 2010). GLP-1 is able to induce several effects that contribute to feeding behaviour. Preliminary data from our laboratory also suggest that, at least some of those effects, might mediate through regulation of AMPK and p70S6K in VMH and LH.

7. Conclusions

Glucoregulatory mechanisms are of primary functional concern to provide a continued glucose supply to the central nervous system and to face metabolic needs of peripheral tissues. Glucose sensors are molecular designs that accurately measure glucose concentrations in the extracellular space facilitating the mechanisms need to maintain glucose homeostasis. GK might be responsible of glucose sensing in some of hypothalamic GE and GI neurons (VMH, LH ARC, PVN and dorsomedial nucleus). GK properties of high-Km phosphorylation of glucose and that it is not inhibited by glucose-6-phosphate, enable that glucose catabolism be proportional to glucose levels in the extracellular space. Also, the functional coexpression of GK with GLUT-2, GKRP and GLP-1R in hypothalamic areas implied in feeding behaviour, could orchestrate regulatory signals to maintain body weight and energy balance. Glucose, orexigenic and anorexigenic peptides contribute to control GK, as well as other energetic sensors such as AMPK. The effect of nutrients occurs on GK and AMPK enzyme activities as required by a short-term response and in a distinctive pattern between VMH and LH. Also, GLP-1 produced a significant reduction of glucose metabolism in selective areas of human brain including hypothalamus and brainstem, both areas involved in feeding behaviour. These findings open new doors for studying the effects of others regulatory peptides in subjects under control and pathophysiological situations. In summary, this chapter has shown a view of the complexity of the network of regulatory signals, where GK, AMPK and regulatory peptides are involved, leading to an optimal energy balance and body weight.

8. Acknowledgment

This work was supported by the CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spain and from the Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, Spain and from Complutense University of Madrid-Santander Bank, Spain.

9. References

- Adachi, A.; Kobashi, M. & Funahashi, M. (1995). Glucose-responsive neurons in the brainstem. *Obes Res*, Vol.3 Suppl 5, (Dec), pp. 735S-740S.
- Adage, T.; Scheurink, A. J.; de Boer, S. F.; de Vries, K.; Konsman, J. P.; Kuipers, F.; Adan, R. A.; Baskin, D. G.; Schwartz, M. W. & van Dijk, G. (2001). Hypothalamic, metabolic, and behavioral responses to pharmacological inhibition of CNS melanocortin signaling in rats. *J Neurosci*, Vol.21, No.10, (May 15), pp. 3639-3645.

- Agius, L. & Peak, M. (1993). Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin. *Biochem J*, Vol.296 (Pt 3), (Dec 15), pp. 785-796.
- Alvarez, E.; Martinez, M. D.; Roncero, I.; Chowen, J. A.; Garcia-Cuartero, B.; Gispert, J. D.; Sanz, C.; Vazquez, P.; Maldonado, A.; de Caceres, J.; Desco, M.; Pozo, M. A. & Blazquez, E. (2005). The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem*, Vol.92, No.4, (Feb), pp. 798-806.
- Alvarez, E.; Roncero, I.; Chowen, J. A.; Thorens, B. & Blazquez, E. (1996). Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem*, Vol.66, No.3, (Mar), pp. 920-927.
- Alvarez, E.; Roncero, I.; Chowen, J. A.; Vazquez, P. & Blazquez, E. (2002). Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. *J Neurochem*, Vol.80, No.1, (Jan), pp. 45-53.
- Anand, B. K.; Chhina, G. S.; Sharma, K. N.; Dua, S. & Singh, B. (1964). Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *Am J Physiol*, Vol.207, (Nov), pp. 1146-1154.
- Arden, C.; Baltrusch, S. & Agius, L. (2006). Glucokinase regulatory protein is associated with mitochondria in hepatocytes. *FEBS Lett*, Vol.580, No.8, (Apr 3), pp. 2065-2070.
- Ashcroft, F. & Rorsman, P. (2004). Type 2 diabetes mellitus: not quite exciting enough? *Hum Mol Genet*, Vol.13 Spec No 1, (Apr 1), pp. R21-31.
- Ashford, M. L.; Boden, P. R. & Treherne, J. M. (1990). Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflugers Arch*, Vol.415, No.4, (Jan), pp. 479-483.
- Baltrusch, S.; Lenzen, S.; Okar, D. A.; Lange, A. J. & Tiedge, M. (2001). Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *J Biol Chem*, Vol.276, No.47, (Nov 23), pp. 43915-43923.
- Batterham, R. L.; Cowley, M. A.; Small, C. J.; Herzog, H.; Cohen, M. A.; Dakin, C. L.; Wren, A. M.; Brynes, A. E.; Low, M. J.; Ghatei, M. A.; Cone, R. D. & Bloom, S. R. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, Vol.418, No.6898, (Aug 8), pp. 650-654.
- Bernard, C. (1849). Chiens rendus diabetiques. *Compt Rend Soc Biol*, Vol.1, pp. 60
- Borg, W. P.; Sherwin, R. S.; Doring, M. J.; Borg, M. A. & Shulman, G. I. (1995). Local ventromedial hypothalamus glucopenia triggers counterregulatory hormone release. *Diabetes*, Vol.44, No.2, (Feb), pp. 180-184.
- Bray, G. A. (1992). Peptides affect the intake of specific nutrients and the sympathetic nervous system. *Am J Clin Nutr*, Vol.55, No.1 Suppl, (Jan), pp. 265S-271S.
- Burdakov, D. & Ashcroft, F. M. (2002). Shedding new light on brain metabolism and glial function. *J Physiol*, Vol.544, No.2, (Oct 15), pp. 334.
- Burdakov, D. & Lesage, F. (2010). Glucose-induced inhibition: how many ionic mechanisms? *Acta Physiol (Oxf)*, Vol.198, No.3, (Mar), pp. 295-301.

- Burdakov, D.; Luckman, S. M. & Verkhatsky, A. (2005). Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol.360, No.1464, (December 29, 2005), pp. 2227-2235.
- Claret, M.; Smith, M. A.; Batterham, R. L.; Selman, C.; Choudhury, A. I.; Fryer, L. G.; Clements, M.; Al-Qassab, H.; Heffron, H.; Xu, A. W.; Speakman, J. R.; Barsh, G. S.; Viollet, B.; Vaulont, S.; Ashford, M. L.; Carling, D. & Withers, D. J. (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest*, Vol.117, No.8, (Aug), pp. 2325-2336.
- Coiro, V.; Saccani-Jotti, G.; Rubino, P.; Manfredi, G.; Melani, A. & Chiodera, P. (2006). Effects of ghrelin on circulating neuropeptide Y levels in humans. *Neuro Endocrinol Lett*, Vol.27, No.6, (Dec), pp. 755-757.
- Cone, R. D.; Cowley, M. A.; Butler, A. A.; Fan, W.; Marks, D. L. & Low, M. J. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, Vol.25 Suppl 5, (Dec), pp. S63-67.
- Cornish-Bowden, A. & Storer, A. C. (1986). Mechanistic origin of the sigmoidal rate behaviour of rat liver hexokinase D ('glucokinase'). *Biochem J*, Vol.240, No.1, (Nov 15), pp. 293-296.
- Cota, D.; Proulx, K.; Smith, K. A.; Kozma, S. C.; Thomas, G.; Woods, S. C. & Seeley, R. J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, Vol.312, No.5775, (May 12), pp. 927-930.
- Christesen, H. B.; Jacobsen, B. B.; Odili, S.; Buettger, C.; Cuesta-Munoz, A.; Hansen, T.; Brusgaard, K.; Massa, O.; Magnuson, M. A.; Shiota, C.; Matschinsky, F. M. & Barbetti, F. (2002). The second activating glucokinase mutation (A456V): implications for glucose homeostasis and diabetes therapy. *Diabetes*, Vol.51, No.4, (Apr), pp. 1240-1246.
- Dalvi, P. S.; Nazarians-Armavil, A.; Tung, S. & Belsham, D. D. (2011). Immortalized Neurons for the Study of Hypothalamic Function. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Vol., pp.
- Dallaporta, M.; Himmi, T.; Perrin, J. & Orsini, J. C. (1999). Solitary tract nucleus sensitivity to moderate changes in glucose level. *Neuroreport*, Vol.10, No.12, (Aug 20), pp. 2657-2660.
- de Lecea, L.; Kilduff, T. S.; Peyron, C.; Gao, X.; Foye, P. E.; Danielson, P. E.; Fukuhara, C.; Battenberg, E. L.; Gautvik, V. T.; Bartlett, F. S., 2nd; Frankel, W. N.; van den Pol, A. N.; Bloom, F. E.; Gautvik, K. M. & Sutcliffe, J. G. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol.95, No.1, (Jan 6), pp. 322-327.
- Diez-Sampedro, A.; Hirayama, B. A.; Osswald, C.; Gorboulev, V.; Baumgarten, K.; Volk, C.; Wright, E. M. & Koepsell, H. (2003). A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol.100, No.20, (Sep 30), pp. 11753-11758.
- Drucker, D. J. & Asa, S. (1988). Glucagon gene expression in vertebrate brain. *J Biol Chem*, Vol.263, No.27, (Sep 25), pp. 13475-13478.
- Dunn-Meynell, A. A.; Rawson, N. E. & Levin, B. E. (1998). Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺ channel in rat brain. *Brain Research*, Vol.814, No.1-2, pp. 41-54.

- Dunn-Meynell, A. A.; Routh, V. H.; Kang, L.; Gaspers, L. & Levin, B. E. (2002). Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes*, Vol.51, No.7, (Jul), pp. 2056-2065.
- Elmquist, J. K.; Elias, C. F. & Saper, C. B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, Vol.22, No.2, (Feb), pp. 221-232.
- Fioramonti, X.; Lorsignol, A.; Taupignon, A. & Penicaud, L. (2004). A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes*, Vol.53, No.11, (Nov), pp. 2767-2775.
- Garcia-Flores, M.; Zueco, J. A.; Arenas, J. & Blazquez, E. (2002). Expression of glucose transporter-2, glucokinase and mitochondrial glycerolphosphate dehydrogenase in pancreatic islets during rat ontogenesis. *Eur J Biochem*, Vol.269, No.1, (Jan), pp. 119-127.
- Gonzalez, J. A.; Reimann, F. & Burdakov, D. (2009). Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurones. *J Physiol*, Vol.587, No.Pt 1, (Jan 15), pp. 41-48.
- Gribble, F. M.; Williams, L.; Simpson, A. K. & Reimann, F. (2003). A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes*, Vol.52, No.5, (May), pp. 1147-1154.
- Grupe, A.; Hultgren, B.; Ryan, A.; Ma, Y. H.; Bauer, M. & Stewart, T. A. (1995). Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell*, Vol.83, No.1, (Oct 6), pp. 69-78.
- Han, S. M.; Namkoong, C.; Jang, P. G.; Park, I. S.; Hong, S. W.; Katakami, H.; Chun, S.; Kim, S. W.; Park, J. Y.; Lee, K. U. & Kim, M. S. (2005). Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia*, Vol.48, No.10, (Oct), pp. 2170-2178.
- Hara, J.; Beuckmann, C. T.; Nambu, T.; Willie, J. T.; Chemelli, R. M.; Sinton, C. M.; Sugiyama, F.; Yagami, K.; Goto, K.; Yanagisawa, M. & Sakurai, T. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, Vol.30, No.2, (May), pp. 345-354.
- Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol.8, No.10, (Oct), pp. 774-785.
- Hardie, D. G.; Carling, D. & Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem*, Vol.67, pp. 821-855.
- Hardie, D. G.; Hawley, S. A. & Scott, J. W. (2006). AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol*, Vol.574, No.Pt 1, (Jul 1), pp. 7-15.
- Hughes, S. D.; Quaade, C.; Milburn, J. L.; Cassidy, L. & Newgard, C. B. (1991). Expression of normal and novel glucokinase mRNAs in anterior pituitary and islet cells. *J Biol Chem*, Vol.266, No.7, (Mar 5), pp. 4521-4530.
- Iynedjian, P. B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J*, Vol.293 (Pt 1), (Jul 1), pp. 1-13.

- Iynedjian, P. B.; Marie, S.; Wang, H.; Gjinovci, A. & Nazaryan, K. (1996). Liver-specific enhancer of the glucokinase gene. *J Biol Chem*, Vol.271, No.46, (Nov 15), pp. 29113-29120.
- Jordan, S. D.; Konner, A. C. & Bruning, J. C. (2010). Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci*, Vol.67, No.19, (Oct), pp. 3255-3273.
- Kang, L.; Dunn-Meynell, A. A.; Routh, V. H.; Gaspers, L. D.; Nagata, Y.; Nishimura, T.; Eiki, J.; Zhang, B. B. & Levin, B. E. (2006). Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes*, Vol.55, No.2, (Feb), pp. 412-420.
- Kang, L.; Routh, V. H.; Kuzhikandathil, E. V.; Gaspers, L. D. & Levin, B. E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes*, Vol.53, No.3, (Mar), pp. 549-559.
- Kola, B.; Hubina, E.; Tucci, S. A.; Kirkham, T. C.; Garcia, E. A.; Mitchell, S. E.; Williams, L. M.; Hawley, S. A.; Hardie, D. G.; Grossman, A. B. & Korbonits, M. (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, Vol.280, No.26, (Jul 1), pp. 25196-25201.
- Kristensen, B. W.; Noer, H.; Gramsbergen, J. B.; Zimmer, J. & Norberg, J. (2003). Colchicine induces apoptosis in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res*, Vol.964, No.2, (Feb 28), pp. 264-278.
- Lee, K.; Li, B.; Xi, X.; Suh, Y. & Martin, R. J. (2005). Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology*, Vol.146, No.1, (Jan), pp. 3-10.
- Leibowitz, S. F. (1992). Neurochemical-neuroendocrine systems in the brain controlling macronutrient intake and metabolism. *Trends Neurosci*, Vol.15, No.12, (Dec), pp. 491-497.
- Levin, B. E.; Routh, V. H.; Kang, L.; Sanders, N. M. & Dunn-Meynell, A. A. (2004). Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes*, Vol.53, No.10, (Oct), pp. 2521-2528.
- Lossi, L.; Alasia, S.; Salio, C. & Merighi, A. (2009). Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol*, Vol.88, No.4, (Aug), pp. 221-245.
- Lynch, R. M.; Tompkins, L. S.; Brooks, H. L.; Dunn-Meynell, A. A. & Levin, B. E. (2000). Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes*, Vol.49, No.5, (May 1, 2000), pp. 693-700.
- Magnuson, M. A. & Shelton, K. D. (1989). An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. *J Biol Chem*, Vol.264, No.27, (Sep 25), pp. 15936-15942.
- Malaisse, W. J.; Malaisse-Lagae, F.; Davies, D. R.; Vandercammen, A. & Van Schaftingen, E. (1990). Regulation of glucokinase by a fructose-1-phosphate-sensitive protein in pancreatic islets. *Eur J Biochem*, Vol.190, No.3, (Jul 5), pp. 539-545.

- Matschinsky, F.; Liang, Y.; Kesavan, P.; Wang, L.; Froguel, P.; Velho, G.; Cohen, D.; Permutt, M. A.; Tanizawa, Y.; Jetton, T. L. & et al. (1993). Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest*, Vol.92, No.5, (Nov), pp. 2092-2098.
- Matschinsky, F. M. (1990). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes*, Vol.39, No.6, (Jun), pp. 647-652.
- Mayer, J. (1953). Glucostatic Mechanism of Regulation of Food Intake. *New England Journal of Medicine*, Vol.249, No.1, pp. 13-16.
- McCrimmon, R. J.; Fan, X.; Cheng, H.; McNay, E.; Chan, O.; Shaw, M.; Ding, Y.; Zhu, W. & Sherwin, R. S. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase within the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses in rats with defective counterregulation. *Diabetes*, Vol.55, No.6, (Jun), pp. 1755-1760.
- Minokoshi, Y.; Alquier, T.; Furukawa, N.; Kim, Y. B.; Lee, A.; Xue, B.; Mu, J.; Foulfelle, F.; Ferre, P.; Birnbaum, M. J.; Stuck, B. J. & Kahn, B. B. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, Vol.428, No.6982, (Apr 1), pp. 569-574.
- Mora, F.; Exposito, I.; Sanz, B. & Blazquez, E. (1992). Selective release of glutamine and glutamic acid produced by perfusion of GLP-1 (7-36) amide in the basal ganglia of the conscious rat. *Brain Res Bull*, Vol.29, No.3-4, (Sep-Oct), pp. 359-361.
- Morrison, B., 3rd; Cater, H. L.; Benham, C. D. & Sundstrom, L. E. (2006). An in vitro model of traumatic brain injury utilising two-dimensional stretch of organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci Methods*, Vol.150, No.2, (Jan 30), pp. 192-201.
- Moukil, M. A.; Veiga-da-Cunha, M. & Van Schaftingen, E. (2000). Study of the regulatory properties of glucokinase by site-directed mutagenesis: conversion of glucokinase to an enzyme with high affinity for glucose. *Diabetes*, Vol.49, No.2, (Feb), pp. 195-201.
- Mountjoy, P. D. & Rutter, G. A. (2007). Glucose sensing by hypothalamic neurones and pancreatic islet cells: AMPle evidence for common mechanisms? *Exp Physiol*, Vol.92, No.2, (Mar), pp. 311-319.
- Munoz-Alonso, M. J.; Guillemain, G.; Kassis, N.; Girard, J.; Burnol, A. F. & Leturque, A. (2000). A novel cytosolic dual specificity phosphatase, interacting with glucokinase, increases glucose phosphorylation rate. *J Biol Chem*, Vol.275, No.42, (Oct 20), pp. 32406-32412.
- Navarro, M.; Rodriguez de Fonseca, F.; Alvarez, E.; Chowen, J. A.; Zueco, J. A.; Gomez, R.; Eng, J. & Blazquez, E. (1996). Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem*, Vol.67, No.5, (Nov), pp. 1982-1991.
- Niswender, K. (2010). Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction - a complex interplay. *Diabetes Obes Metab*, Vol.12, No.4, (Apr), pp. 267-287.
- Noraberg, J.; Poulsen, F. R.; Blaabjerg, M.; Kristensen, B. W.; Bonde, C.; Montero, M.; Meyer, M.; Gramsbergen, J. B. & Zimmer, J. (2005). Organotypic hippocampal slice cultures

- for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, Vol.4, No.4, (Aug), pp. 435-452.
- Oomura, Y.; Ono, T.; Ooyama, H. & Wayner, M. J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature*, Vol.222, No.5190, (Apr 19), pp. 282-284.
- Oomura, Y.; Ooyama, H.; Sugimori, M.; Nakamura, T. & Yamada, Y. (1974). Glucose inhibition of the glucose-sensitive neurone in the rat lateral hypothalamus. *Nature*, Vol.247, No.439, (Feb 1), pp. 284-286.
- Oomura, Y. & Yoshimatsu, H. (1984). Neural network of glucose monitoring system. *J Auton Nerv Syst*, Vol.10, No.3-4, (May-Jun), pp. 359-372.
- Orskov, C.; Poulsen, S. S.; Moller, M. & Holst, J. J. (1996). Glucagon-like peptide I receptors in the subfornical organ and the area postrema are accessible to circulating glucagon-like peptide I. *Diabetes*, Vol.45, No.6, (Jun), pp. 832-835.
- Pellerin, L. & Magistretti, P. J. (2004). Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist*, Vol.10, No.1, (Feb), pp. 53-62.
- Penicaud, L.; Leloup, C.; Fioramonti, X.; Lorsignol, A. & Benani, A. (2006). Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, Vol.9, No.4, (Jul), pp. 458-462.
- Perrin, C.; Knauf, C. & Burcelin, R. (2004). Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis. *Endocrinology*, Vol.145, No.9, (Sep), pp. 4025-4033.
- Ritter, S. & Dinh, T. T. (1994). 2-Mercaptoacetate and 2-deoxy-D-glucose induce Fos-like immunoreactivity in rat brain. *Brain Res*, Vol.641, No.1, (Mar 28), pp. 111-120.
- Ritter, S.; Dinh, T. T. & Zhang, Y. (2000). Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Res*, Vol.856, No.1-2, (Feb 21), pp. 37-47.
- Rodriguez de Fonseca, F.; Navarro, M.; Alvarez, E.; Roncero, I.; Chowen, J. A.; Maestre, O.; Gomez, R.; Munoz, R. M.; Eng, J. & Blazquez, E. (2000). Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism*, Vol.49, No.6, (Jun), pp. 709-717.
- Roncero, I.; Alvarez, E.; Chowen, J. A.; Sanz, C.; Rabano, A.; Vazquez, P. & Blazquez, E. (2004). Expression of glucose transporter isoform GLUT-2 and glucokinase genes in human brain. *J Neurochem*, Vol.88, No.5, (Mar), pp. 1203-1210.
- Roncero, I.; Alvarez, E.; Vazquez, P. & Blazquez, E. (2000). Functional glucokinase isoforms are expressed in rat brain. *J Neurochem*, Vol.74, No.5, (May), pp. 1848-1857.
- Roncero, I.; Sanz, C.; Alvarez, E.; Vazquez, P.; Barrio, P. A. & Blazquez, E. (2009). Glucokinase and glucokinase regulatory proteins are functionally coexpressed before birth in the rat brain. *J Neuroendocrinol*, Vol.21, No.12, (Dec), pp. 973-981.
- Ropelle, E. R.; Pauli, J. R.; Fernandes, M. F.; Rocco, S. A.; Marin, R. M.; Morari, J.; Souza, K. K.; Dias, M. M.; Gomes-Marcondes, M. C.; Gontijo, J. A.; Franchini, K. G.; Velloso, L. A.; Saad, M. J. & Carvalheira, J. B. (2008). A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes*, Vol.57, No.3, (Mar), pp. 594-605.

- Routh, V. H. (2002). Glucose-sensing neurons: Are they physiologically relevant? *Physiology & Behavior*, Vol.76, No.3, pp. 403-413.
- Rutter, G. A.; Da Silva Xavier, G. & Leclerc, I. (2003). Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J*, Vol.375, No.Pt 1, (Oct 1), pp. 1-16.
- Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R. M.; Tanaka, H.; Williams, S. C.; Richardson, J. A.; Kozlowski, G. P.; Wilson, S.; Arch, J. R.; Buckingham, R. E.; Haynes, A. C.; Carr, S. A.; Annan, R. S.; McNulty, D. E.; Liu, W. S.; Terrett, J. A.; Elshourbagy, N. A.; Bergsma, D. J. & Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, Vol.92, No.4, (Feb 20), pp. 573-585.
- Sanz, C.; Roncero, I.; Vazquez, P.; Navas, M. A. & Blazquez, E. (2007). Effects of glucose and insulin on glucokinase activity in rat hypothalamus. *J Endocrinol*, Vol.193, No.2, (May), pp. 259-267.
- Sanz, C.; Vazquez, P.; Navas, M. A.; Alvarez, E. & Blazquez, E. (2008). Leptin but not neuropeptide Y up-regulated glucagon-like peptide 1 receptor expression in GT1-7 cells and rat hypothalamic slices. *Metabolism*, Vol.57, No.1, (Jan), pp. 40-48.
- Schuit, F. C.; Huypens, P.; Heimberg, H. & Pipeleers, D. G. (2001). Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes*, Vol.50, No.1, (Jan), pp. 1-11.
- Shiota, C.; Coffey, J.; Grimsby, J.; Grippo, J. F. & Magnuson, M. A. (1999). Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem*, Vol.274, No.52, (Dec 24), pp. 37125-37130.
- Silver, I. A. & Erecinska, M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci*, Vol.14, No.8, (Aug), pp. 5068-5076.
- Silver, I. A. & Erecinska, M. (1998). Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *J Neurophysiol*, Vol.79, No.4, (Apr), pp. 1733-1745.
- Song, Z. & Routh, V. H. (2005). Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes*, Vol.54, No.1, (Jan), pp. 15-22.
- Sundstrom, L.; Morrison, B., 3rd; Bradley, M. & Pringle, A. (2005). Organotypic cultures as tools for functional screening in the CNS. *Drug Discov Today*, Vol.10, No.14, (Jul 15), pp. 993-1000.
- Sutherland, V. L.; McReynolds, M.; Tompkins, L. S.; Brooks, H. L. & Lynch, R. M. (2005). Developmental expression of glucokinase in rat hypothalamus. *Brain Res Dev Brain Res*, Vol.154, No.2, (Feb 8), pp. 255-258.
- Tang-Christensen, M.; Larsen, P. J.; Thulesen, J.; Romer, J. & Vrang, N. (2000). The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med*, Vol.6, No.7, (Jul), pp. 802-807.

- Tippett, P. S. & Neet, K. E. (1982). An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A. *J Biol Chem*, Vol.257, No.21, (Nov 10), pp. 12846-12852.
- Tong, Q.; Ye, C.; McCrimmon, R. J.; Dhillon, H.; Choi, B.; Kramer, M. D.; Yu, J.; Yang, Z.; Christiansen, L. M.; Lee, C. E.; Choi, C. S.; Zigman, J. M.; Shulman, G. I.; Sherwin, R. S.; Elmquist, J. K. & Lowell, B. B. (2007). Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab*, Vol.5, No.5, (May), pp. 383-393.
- Toyoda, Y.; Miwa, I.; Satake, S.; Anai, M. & Oka, Y. (1995). Nuclear location of the regulatory protein of glucokinase in rat liver and translocation of the regulator to the cytoplasm in response to high glucose. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol.215, No.2, (Oct 13), pp. 467-473.
- Tsuneki, H.; Wada, T. & Sasaoka, T. (2010). Role of orexin in the regulation of glucose homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)*, Vol.198, No.3, (Mar), pp. 335-348.
- Turnley, A. M.; Stapleton, D.; Mann, R. J.; Witters, L. A.; Kemp, B. E. & Bartlett, P. F. (1999). Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem*, Vol.72, No.4, (Apr), pp. 1707-1716.
- Turton, M. D.; O'Shea, D.; Gunn, I.; Beak, S. A.; Edwards, C. M.; Meeran, K.; Choi, S. J.; Taylor, G. M.; Heath, M. M.; Lambert, P. D.; Wilding, J. P.; Smith, D. M.; Ghatei, M. A.; Herbert, J. & Bloom, S. R. (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, Vol.379, No.6560, (Jan 4), pp. 69-72.
- Uttenthal, L. O.; Toledano, A. & Blazquez, E. (1992). Autoradiographic localization of receptors for glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in rat brain. *Neuropeptides*, Vol.21, No.3, (Mar), pp. 143-146.
- Van Schaftingen, E. (1989). A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *Eur J Biochem*, Vol.179, No.1, (Jan 15), pp. 179-184.
- Van Schaftingen, E.; Bartrons, R. & Hers, H. G. (1984). The mechanism by which ethanol decreases the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in the liver. *Biochem J*, Vol.222, No.2, (Sep 1), pp. 511-518.
- Vandercammen, A. & Van Schaftingen, E. (1993). Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase. *Biochem J*, Vol.294 (Pt 2), (Sep 1), pp. 551-556.
- Viollet, B.; Athes, Y.; Mounier, R.; Guigas, B.; Zarrinpashneh, E.; Horman, S.; Lantier, L.; Hebrard, S.; Devin-Leclerc, J.; Beauloye, C.; Foretz, M.; Andreelli, F.; Ventura-Clapier, R. & Bertrand, L. (2009). AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci*, Vol.14, pp. 19-44.
- Vionnet, N.; Stoffel, M.; Takeda, J.; Yasuda, K.; Bell, G. I.; Zouali, H.; Lesage, S.; Velho, G.; Iris, F.; Passa, P. & et al. (1992). Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, Vol.356, No.6371, (Apr 23), pp. 721-722.
- Wang, R.; Liu, X.; Hentges, S. T.; Dunn-Meynell, A. A.; Levin, B. E.; Wang, W. & Routh, V. H. (2004). The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate

nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes*, Vol.53, No.8, (Aug), pp. 1959-1965.

- Yang, X. J.; Kow, L. M.; Funabashi, T. & Mobbs, C. V. (1999). Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes*, Vol.48, No.9, (Sep), pp. 1763-1772.
- Yang, X. J.; Kow, L. M.; Pfaff, D. W. & Mobbs, C. V. (2004). Metabolic pathways that mediate inhibition of hypothalamic neurons by glucose. *Diabetes*, Vol.53, No.1, (Jan), pp. 67-73.
- Zhou, L.; Podolsky, N.; Sang, Z.; Ding, Y.; Fan, X.; Tong, Q.; Levin, B. E. & McCrimmon, R. J. (2010). The Medial Amygdalar Nucleus: A Novel Glucose-Sensing Region That Modulates the Counterregulatory Response to Hypoglycemia. *Diabetes*, Vol.59, No.10, (October 1, 2010), pp. 2646-2652.

HOT TOPICS IN ENDOCRINE AND ENDOCRINE-RELATED DISEASES

Edited by **Monica Fedele**

Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases

<http://dx.doi.org/10.5772/46124>

Edited by Monica Fedele

Contributors

Carmen Sanz, Veronica Hurtado, Isabel Roncero, Enrique Blazquez, Elvira Alvarez, Imre Zoltan Kun, Zsuzsanna Szanto, Jozsef Balazs, Anisie Nasalean, Camelia Gliga, Cristina Carnovale, Paola Ingaramo, Daniel Francés, M. Teresa Ronco, Ebe D'Adamo, Benjamin U. Nwosu, Vania Maria Correa Da Costa, Antongiulio Faggiano, Manuel Estrada, Carla Basualto-Alarcón, Enrique Jaimovich, Rodrigo Maass, Marie-Lise Jaffrain-Rea, Emrah Yerlikaya, Fulya Akin

Published by InTech

Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia

Copyright © 2013 InTech

All chapters are Open Access distributed under the Creative Commons Attribution 3.0 license, which allows users to download, copy and build upon published articles even for commercial purposes, as long as the author and publisher are properly credited, which ensures maximum dissemination and a wider impact of our publications. However, users who aim to disseminate and distribute copies of this book as a whole must not seek monetary compensation for such service (excluded InTech representatives and agreed collaborations). After this work has been published by InTech, authors have the right to republish it, in whole or part, in any publication of which they are the author, and to make other personal use of the work. Any republication, referencing or personal use of the work must explicitly identify the original source.

Notice

Statements and opinions expressed in the chapters are these of the individual contributors and not necessarily those of the editors or publisher. No responsibility is accepted for the accuracy of information contained in the published chapters. The publisher assumes no responsibility for any damage or injury to persons or property arising out of the use of any materials, instructions, methods or ideas contained in the book.

Publishing Process Manager Oliver Kurelic

Technical Editor InTech DTP team

Cover InTech Design team

First published May, 2013

Printed in Croatia

A free online edition of this book is available at www.intechopen.com

Additional hard copies can be obtained from orders@intechopen.com

Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases, Edited by Monica Fedele

p. cm.

ISBN 978-953-51-1080-4

Contents

Preface VII

- Chapter 1 **Hereditary Neuroendocrine Tumor Syndromes 1**
Antongiulio Faggiano, Valeria Ramundo, Luisa Circelli and Annamaria Colao
- Chapter 2 **New Insights in the Pathogenesis of Pituitary Tumours 27**
Marie-Lise Jaffrain-Rea, Sandra Rotondi and Edoardo Alesse
- Chapter 3 **Aging and Subclinical Thyroid Dysfunction 85**
Corrêa V. M. da Costa and D. Rosenthal
- Chapter 4 **Detection of Iodine Deficiency Disorders (Goiter and Hypothyroidism) in School-Children Living in Endemic Mountainous Regions, After the Implementation of Universal Salt Iodization 101**
Imre Zoltán Kun, Zsuzsanna Szántó, József Balázs, Anisie Nășălean and Camelia Gliga
- Chapter 5 **Diabetes and Its Hepatic Complication 129**
Paola I. Ingaramo, Daniel E. Francés, María T. Ronco and Cristina E. Carnovale
- Chapter 6 **Double Diabetes: The Search for a Treatment Paradigm in Children and Adolescents 145**
Benjamin U. Nwosu
- Chapter 7 **Glucagon-Like Peptide-1 and Its Implications in Obesity 165**
Veronica Hurtado, Isabel Roncero, Enrique Blazquez, Elvira Alvarez and Carmen Sanz

- Chapter 8 **The Insulin-Like Growth Factor System in the Human Pathology 197**
Emrah Yerlikaya and Fulya Akin
- Chapter 9 **Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease 221**
Ebe D'Adamo, M. Loredana Marcovecchio, Tommaso de Giorgis, Valentina Chiavaroli, Cosimo Giannini, Francesco Chiarelli and Angelika Mohn
- Chapter 10 **Anabolic/Androgenic Steroids in Skeletal Muscle and Cardiovascular Diseases 237**
Carla Basualto-Alarcón, Rodrigo Maass, Enrique Jaimovich and Manuel Estrada

Preface

The endocrine system plays a vital role in whether or not you develop a wide range of diseases, not only including strictly endocrine-diseases.

This book includes selected contemporary topics representing exciting recent developments in the field of endocrine and endocrine-related diseases. It is the result of a collaboration among eminent scientists and clinicians coming from eight different countries, including Argentina, Brazil, Chile, Italy, Romania, Spain, Turkey and United States.

Basic and advanced recent trends and research studies in a number of endocrine and endocrine-related disorders are covered by the different chapters of the book. We will read about hereditary neuroendocrine tumors, with emphasis on their still poorly defined natural history and clinical course; pituitary tumors, with a comprehensive overview of the recent advances in their pathogenesis; thyroid dysfunctions, including those related to aging and iodine deficiency; diabetes, with its hepatic complications, and double diabetes, a new definition that summarizes the coexistence of features of both type 1 and type 2 diabetes in the same individual, with a comprehensive discussion of the various aspects of this disorder and a focus on the search for a treatment paradigm in children and adolescents. Moreover, we will read about the testosterone as a new player in metabolic disorders and as a potential drug to counteract skeletal muscle diseases; the glucagon-like peptide type 1 and its multiple actions for which it can be considered an anti-diabetogenic agent and may have important implications in pathophysiological states such as obesity; the insulin-like-growth-factor role in different human pathologies, including cancer; and the pediatric nonalcoholic fatty liver disease.

I hope that, at the end, the reader will have a critic and advanced overview of selected hot pathologies related to the endocrine field.

Dr. Monica Fedele

Institute of Experimental Endocrinology and Oncology,
National Research Council,
Naples, Italy

Glucagon-Like Peptide-1 and Its Implications in Obesity

Veronica Hurtado, Isabel Roncero,
Enrique Blazquez, Elvira Alvarez and Carmen Sanz

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/54221>

1. Introduction

Glucagon-like peptide (GLP-1) is derived from the processing of the proglucagon gene. This peptide has diverse biological activities affecting peripheral tissues and the central nervous system. Thus, for example, GLP-1 stimulates pancreas insulin secretion in a glucose-dependent manner after eating, hence its denomination as an “incretin”. GLP-1 has also been considered an anorexigenic peptide, while also reducing cerebral glucose metabolism in the human hypothalamus and brain stem. These GLP-1 actions in the pancreas and central nervous system are achieved through GLP-1 receptors (GLP-1R) that share the same gene sequence in both tissues. In short, GLP-1 is an antidiabetogenic agent due to its action in the pancreas while acting in hypothalamic areas, helping to generate a state of satiety. Interestingly, GLP-1/exendin-4 administration in obese Zucker rats, which also develop insulin resistance, hyperinsulinemia and hyperlipidemia, reduces food intake and induced weight loss, which applies to lean rats, too.

The mid 20th century recorded the first indications that the hypothalamus plays a major role in feeding behaviour and energy homeostasis, whereby the electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus (VMH) suppresses food intake, and the bilateral lesions of these structures induce hyperphagia and obesity. The VMH was therefore called the satiety centre. In contrast, alterations in the lateral hypothalamic area (LH) induced the opposite set of responses, and the LH was hence called the hunger centre. At least two kinds of glucose sensor neurons have been described in the brain: glucose-excited neurons are located mainly in the VMH and are excited by increased glucose levels in the extracellular space, while glucose-inhibited neurons (mainly present in the LH) are excited by decreases in glucose concentrations. A direct relationship has also been established between the regulation of food intake and energy homeostasis and hypothalamic metabolic sensor activities.

Both AMP-activated protein kinase (AMPK) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) and its downstream target p70 ribosomal protein S6 Kinase 1 (S6K1) contribute to detecting cellular energy and integrate nutrient and hormonal signals in order to maintain energy homeostasis in the organism. Thus, the Ser/Thr kinase AMPK is activated during energy depletion, when the AMP/ATP ratio increases and triggers a large number of downstream effectors by stimulating ATP-generating catabolic pathways and inhibiting anabolic pathways in order to restore the energy balance. Specifically, it has been reported that fasting increases, and re-feeding decreases, AMPK activity in several hypothalamic areas. Likewise, the hypothalamic mTOR/S6K1 pathway has also been involved in the control of feeding and in the regulation of energy balances. Thus, mTOR is activated by glucose and amino acids and, therefore, hypothalamic AMPK and mTOR/S6K1 respond to changes in glucose and other nutrients in the opposite way, and their effects on the regulation of food intake may overlap. Our recent results indicate that AMPK and S6K1 are functionally expressed in the VMH and LH areas, with differential activation in response to glucose fluctuations, in both in vitro models of hypothalamic organotypic slice cultures and animals in response to fasting and re-feeding, as well as in Zucker obese rats with a lower activation degree of hypothalamic AMPK in response to fasting.

In addition, we have reported that GLP-1/exendin-4 treatment inhibits the activities of AMPK and S6K1 when the activation of these protein kinases peak in both the VMH and LH areas. In pathophysiological situations, as occurs in Zucker obese rats, exendin-4 seems to act as a compensator for the variations in AMPK activity produced either by oscillations in glucose levels or by pathologies such as obesity or episodes of hyperinsulinemia.

In conclusion, it seems that GLP-1/exendin-4 acts in the VMH and LH, modulating the activation status of AMPK and S6K1 in response to glucose fluctuations, helping to improve pathophysiological states such as obesity and insulin resistance. The effects of these peptides in the hypothalamus are mediated through the activation of PKA, PKC and PI3K, as well as the phosphatase PP2.

2. Glucagon-like peptide-1: Dual role as an incretin and anorexigenic peptide

Glucagon and related peptides constitute a family derived from the proglucagon molecule, which is identical in sequence in the pancreas, intestine and brain [1], although post-translational processing of the precursor yields different products in these organs [2]. (Figure 1)

In gut L-cells, the C-terminal portion of proglucagon is predominantly processed to glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and GLP-2. Further processing of GLP-1 in these cells produces the amidated and truncated forms of the peptide: GLP-1 [7-36] amide, GLP-1 [7-37] and GLP-1 [1-36] amide, with the first two being the biologically active forms, which are cited in the rest of the text as GLP-1. Although the truncated forms of GLP-1 are reported to have strong incretin activity, it is currently known that they are also important in the functioning of other peripheral tissues and the central nervous system. Both forms of the peptide are in-

distinguishable in their ability to produce biological effects through GLP-1 receptors located in pancreatic cells [3], gastric glands [4] and in adipocytes [5], lung [6] and brain [7-10].

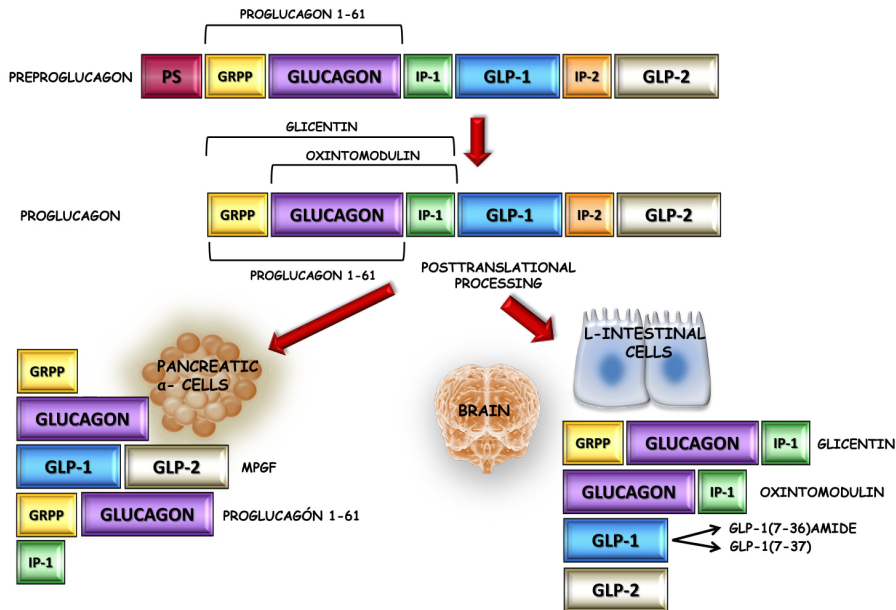


Figure 1. Posttranslational processing of preproglucagon. GLP: Glucagon-like peptide; GRPP: Glucitin-related pancreatic peptide; IP: Intermediate peptide; MPGF: the major proglucagon fragment; PS: Signal peptide.

In addition, GLP-1 and its own receptors are synthesized in the same brain regions, strongly supporting the actions of this peptide on the CNS. Thus, the perfusion of several brain nuclei with GLP-1 produces a selective release of neurotransmitters [11, 12], and the central and peripheral administration of this peptide inhibits food and drink intake [13-15]. The co-expression of GLP-1R, glucokinase, and glucose transporter protein 2 (GLUT-2) in the neurons involved in the control of food intake suggests that these cells may play a role in glucose sensing in the brain [14, 16-19]. Furthermore, GLP-1 has beneficial cardiovascular effects in humans by lowering blood pressure and improving myocardial function [20, 21], although in rats this peptide significantly increases arterial blood pressure and heart rate [22, 23]. Interestingly, GLP-1 has proliferative and antiapoptotic actions on pancreatic β -cells [24, 25], and has neurotrophic and neuroprotective features [21]. Considering the functions of GLP-1, its exendin-4 analogue is used in the treatment of type 2 diabetes [26].

Within the multiple functions of GLP-1, we have selected two important ones, namely, an incretin and an anorexigenic peptide.

2.1. GLP-1 actions as incretin hormone

The proposals made in 1906 by Moore et al. [27] on the antidiabetogenic effect of intestinal factors, and in 1929 by Zung & La Barre [28] on the release of a substance from intestinal mucosa with properties to decrease glycaemia, signalled the start of the development of the incretin concept and the study of the relationships between the gut and the endocrine pancreas. However, for many years these suggestions were ignored, until the development of radioimmunoassays, when Elrich et al. [29] demonstrated that the insulin secretion response to an oral glucose overload was greater to that obtained after intravenous perfusion with the same amount of glucose. This lends support to the belief that substances from the intestine were involved in the postprandial control of insulin secretion, which was referred to accordingly as the incretin effect. It is accepted that 20% to 60% of the increase in postprandial insulin secretion is due to this effect; with the broad oscillation being explained by the amount and composition of food intake.

The functional relationships between the intestine and the pancreatic islet were named by Unger and Eisentraut in 1969 [30] as the enteroinsular axis, while the criteria formulated by Creutzfeldt [31] considered a molecule to be incretin when it is secreted in response to nutrients, and that physiological concentrations increased the secretion of insulin in the presence of high glucose concentrations.

The first peptide described with incretin activity was the gastric inhibitory polypeptide (GIP) that went on to be referred to also as the glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP). Thereafter, the observation of incretin activity after the inactivation of GIP suggested the existence of other molecules with an incretin effect. Thus, in experimental models where GIP was blocked by its own antibodies 50-80% of incretin activity was still observed. We now know that GLP-1 has a greater incretin effect than GIP, being considered the most powerful incretin molecule of all those known. In other words, a molecule with incretin activity may be defined as a hormone of intestinal origin that potentiates the secretion of insulin after the oral ingestion of nutrients. Knowledge of incretins has been very useful for a better understanding of certain pathophysiological entities [32]. In 1986, Nauck et al. [33] first documented a reduced incretin effect in patients, with type 2 diabetes. It is important to note that Nauck et al. described this reduced effect with GIP and not with GLP-1, because at that time GIP was the only incretin known. However, a year later [34], GLP-1 was identified as an incretin hormone and shown to be more effective than GIP to stimulate insulin secretion on a molar basis and at an equivalent level of glucose concentration [35]. Both in non-diabetic and type 2 diabetic subjects, GLP-1 was more effective than GIP at enhancing insulin secretion and lowering glucagon concentrations [36].

The recognition that native GLP-1 is quickly degraded by the protease dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) led to the development of GLP-1 agonists that are resistant to this enzyme [37]. The degradation by DPP-4 of exenatide and liraglutide and DPP-4 inhibitors (sitagliptin, saxagliptin, vildagliptin and linagliptin) currently represents an effective therapeutic option for patients with type 2 diabetes. Furthermore, several agents have been developed in recent years, including longer acting DPP-4 resistant GLP-1 agonists.

In addition, many biological effects of GLP-1, other than incretin actions, have been reported in recent decades, representing a good tool for several therapeutic treatments. These GLP-1 effects include properties such as an anorexic peptide, beneficial cardiovascular actions in humans, increased pulmonary surfactant formation in human and experimental animals, pancreatic islet neogenesis and proliferative and antiapoptotic actions. GLP-1 receptors are also widely expressed in the brain [9, 10], where their agonists produce a selective release of neurotransmitters [11, 12] and increase GLP-1 receptor expression in glia after a mechanical lesion of the rat brain has been reported [38]. Accordingly pre-clinical data suggest a neuro-protective/neurotrophic function of GLP-1, and some authors have proposed that this peptide may have a positive potential role for reversing neurodegenerative disorders [21].

2.2. GLP-1 actions in the control of food intake

A number of peptide hormones, previously thought to be specific to the gastroenteropancreatic system and later found also in the mammalian brain, have been shown to modulate appetite, energy homeostasis and body weight. They have these physiological effects together with other neuropeptides, such as neuropeptide Y (NPY), opioid peptides, galanin, vasopressin, and GHRH. Peptide Y (Y_{3-36}) is also released from the gastrointestinal tract postprandially, and acts on the NPY Y_2 receptor in the arcuate nucleus to inhibit feeding, with a long-term effect [39]. Conversely, other satiety signals induced by gut-brain peptides such as GLP-1 [13-15], GLP-2 [40] and cholecystokinin produced a short-term effect, while insulin and leptin [41] inhibit the appetite by increasing the formation of pro-opiomelanocortin (POMC) and reducing NPY action. In addition, ghrelin, a peptide released by the stomach, is stimulated before meals to facilitate NPY action.

GLP-1 and GLP-2 significantly modify feeding behaviour. The intracerebroventricular (icv) or subcutaneous administration (sc) of GLP-1 produced a marked reduction in food intake and water ingestion [13-15]. Exendin-4 proved also to be a potent agonist of GLP-1 by decreasing both food and water intake in a dose-dependent manner. Pre-treatment with exendin [9-39], an inhibitor of the GLP-1 receptor, reversed the inhibitory effects of GLP-1 and exendin-4. These findings suggest that GLP-1 may modulate both food and water intake through either a central or peripheral mechanism. Similar results have been found in humans when the peptide was administered in the periphery [42]. After the subcutaneous administration of GLP-1, it could enter the brain by binding to blood-brain-barrier-free organs such as the subfornical organ and the area postrema [43], or through the choroid plexus, which has a high density of GLP-1 receptors [17].

Several observations suggest a possible action of GLP-1 on thirst-regulatory mechanisms, since GLP-1R mRNA has been located in brain areas related to the control of thirst, such as the preoptic area, glial cells lining the third ventricle and, especially, the neurons of the PVN, which is a key station for water balance regulation through the antidiuretic effects of vasopressin released by its projection to the neurohypophysis [44]. In addition, the icv administration of GLP-1 significantly increases the circulating levels of vasopressin, and the colocalization of the mRNA of the GLP-1 receptor, and vasopressin has been found in the neurons of the PVN [45].

The control of feeding behaviour by GLP-1 and exendin-4 has been explored in Zucker obese rats, resulting in a reduction in food intake, with exendin-4 being much more potent than GLP-1. The long-term sc administration of exendin-4 decreased daily food intake and practically blocked weight gain in obese rats. These observations highlight the potential usefulness of exendin-4 as a tool for treating obesity and/or diabetes. Both GLP-1 and exendin-4 control blood glucose through the stimulation of glucose-dependent insulin secretion, the inhibition of glucagon secretion, and delayed gastric emptying [34, 46, 47], which facilitate the decrease in blood glucose in type 1 and type 2 diabetic patients [48]. In the light of these results, different N-terminal substituted GLP-1 analogues resistant to DPP-IV have recently been developed. These resistant analogues have a prolonged metabolic stability *in vivo* and improved biological activity, which is of great interest in the treatment of type 2 diabetes and/or obesity.

On the other hand, the icv administration of GLP-2 to mice and rats produced a marked decrease in food intake but not in water ingestion [43]. Surprisingly, this effect was avoided by the administration of exendin [9-39], an antagonist of GLP-1.

3. Importance of the VMH and LH in the control of food intake

In recent years, researchers have been focusing on the relationship between gut hormones and the brain areas controlling appetite, ingestion, food reward and body weight [49, 50].

Both gut and brain are considered the main organs responsible for controlling body weight. The hypothalamus is the focus of many of the peripheral signals and neural pathways that control energy homeostasis and body weight. However, new evidence has been forthcoming in recent years to suggest that human food intake is also controlled by other areas in the central nervous system, such as subcortical and cortical areas.

The hypothalamus regulates body weight by precisely balancing the intake of food, energy expenditure and body fat tissue. The role of the hypothalamus in regulating food intake and body weight was established in 1940 [51] through the classical experiments by Hetherington and Ranson. They placed bilateral electrolytic lesions in a vast region of the hypothalamus, occupied by the dorsomedial and ventromedial areas, the arcuate nucleus, the fornix and a portion of the lateral hypothalamic area (without disturbing the pituitary gland). The results were a marked adiposity characterized by a doubling of body weight and a huge increase in body lipids. A few years later, Anand and Brobeck [52] continued these experiments in greater detail, demonstrating that lesions of the lateral hypothalamus at the level adjacent to the ventromedial nucleus caused loss of appetite, inanition, and even death by starvation. Thus, the lateral hypothalamic area acted as a “feeding centre” and the ventromedial nucleus as a “satiety centre”. Since then, it has been established that the “dual centre model” regulates feeding [53], that the proposed lesioning of the VMH increases appetite, while stimulating the VMH decreases it. By contrast, lesioning or stimulating the LH decreases or induces appetite, respectively.

The dual control theory of feeding is based on the homeostatic view of hunger and satiety, together with the consideration of glucose not only as a metabolic fuel, but also as a signaling molecule, and the existence of specialized neurons containing glucose sensors that activate or inhibit feeding when blood glucose levels change. A fall in glucose would activate the LH and, consequently, give rise to hunger. Hunger leads to the consumption of food and thus to an elevation of glucose levels that would activate the VMH, leading to a feeling of satiety that will stop the feeding, and eventually glucose levels would fall again.

Over the last 25 years, there has been a dramatic increase in studies on the hypothalamus. Knowledge of the hypothalamus has only recently evolved from anatomical concepts (nuclei, 'areas' and fibre tracts) to neurochemicals (characterizing the distributions of neuropeptides and transmitters and their receptors), focusing on the modulation of feeding behaviour and energy expenditure. We are now beginning to reach the stage of functionally understanding the molecular mechanisms, defining exactly which neuronal populations respond to specific nutritional and related signals, and how they pass on that information. At least 25 transmitters have been suggested to play key roles in feeding behaviour [54]. Accordingly, the dorsomedial and paraventricular regions are important within the hypothalamus, along with the well-established VMH and LH [55]. The VMH, which consists of the ventromedial and arcuate nuclei, respectively, is a key region for integrating the peripheral signals of nutrient status and adiposity. The arcuate nucleus contains neurons with NPY/AgRP and POMC, which have opposing effects on energy homeostasis. Thus, NPY increases food intake and activates energy sparing mechanisms, while melanocortins decrease food intake and increase energy expenditure [56]. On the other hand, the LH, the classical "feeding centre", is a heterogeneous area that receives a multitude of neuronal inputs from many areas known to be important in the regulation of energy homeostasis: LH encompassing neurons and terminals containing orexigenic peptides. Basically, the LH contains two distinct neuronal cell populations that regulate feeding behaviour: containing hypocretin/orexin [57, 58] and a melanin-concentrating hormone (MCH) [59] (Figure 2).

In addition to its response to circulating peptides and hormones that reflect energy status, the brain, and specifically the hypothalamus, also senses and responds to changes in blood glucose levels [14, 16, 18, 19, 60]. There are several areas in the brain acting as a glucose sensor. Examples of these are the hypothalamus [60, 61], nucleus solitarius [62] and amygdala [63]. The glucose sensing neurons located in these areas monitor energy status and initiate the responses to maintain glucose and energy homeostasis. Besides the brain glucose sensors, there are also glucose sensors located in peripheral tissues including the intestine [64], the carotid body [65] and mesenteric veins [66]. In fact, glucose sensors in the hypothalamus were first discovered in the VMH and LH [57, 58]. Moreover, interstitial glucose levels in the VMH and LH vary with blood glucose concentration [67], and these changes in glucose have been postulated to trigger meal initiation. Since glucose is the brain's primary fuel, it should respond to a severe glucose deficiency. In this way, VMH glucose sensors may play a role in detecting and countering severe glucose deficiency [68]. However, Levin et al. recently showed there was no correlation between VMH glucose levels and spontaneous feeding

[69]. It is therefore unlikely that VMH glucose sensors regulate meal-to-meal food intake, although it does not rule out a role for glucose sensors in the LH or other brain regions.

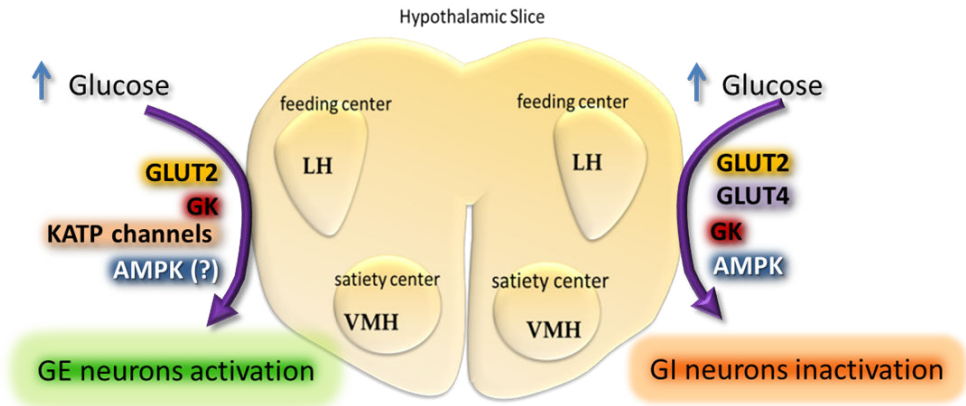


Figure 2. Schematic representation of a hypothalamic slice. Localization of the VMH and LH are indicated. GE and GI neurons are activated or inactivated by a rise in glucose, respectively. The putative components responsible for glucose sensing in GE and GI are shown.

Glucose sensing neurons are those that alter their frequency of potential actions in response to changes in interstitial glucose levels [60, 70]. There are mainly two neurons whose activity is regulated by alterations in glucose levels [60]: Glucose-excited (GE) neurons that increase their potential frequency in response to increases in interstitial glucose from 0.1 to 2.5 mM glucose. The other kind of neurons (GI) are those that decrease their frequency of potential actions when glucose rises. More recently [71], other neurons have been described that respond to an increase of more than 5 mM glucose. Thus, high GE (HGE) and high GI (HGI) neurons increase or decrease their frequency of potential actions, respectively, in response to increases in interstitial glucose from 5 to 20 mM, although these neurons are still not thoroughly characterized, and there are doubts about their physiological significance. However, it is important to consider that the interstitial brain glucose concentration is approximately 30% of the concentrations found in the blood. Thus, when the peripheral plasma glucose concentration is 7.6 mM, the interstitial VMH glucose is only 2.5 mM [67]. Decreasing plasma glucose to 2–3 mM or increasing to 15 mM resulted in brain glucose levels of 0.16 mM and 4.5 mM, respectively [67, 72]. Therefore, glucose concentrations found within the majority of the brain in vivo under physiological and pathophysiological conditions are within the 0.2 to 5 mM range [73–76], and it seems that the GE and GI neurons are mainly responsible for glucose sensing, since it is unclear whether brain glucose levels ever exceed 5 mM in the presence of an intact blood brain barrier. However, it should be noted that hyperglycemia impairs the integrity of the blood brain barrier [77], raising the question of whether HGE and HGI neurons could have a physiological significance in hyperglycemia-associated pathology. Nevertheless, it seems that glucose sensing neurons could be functioning to protect the brain against a severe energy deficit.

The components responsible for glucose sensing in GE neurons seem to be shared with those present in pancreatic beta-cells: GLUT2, as well as glucokinase. Furthermore, GE uses the ATP-sensitive potassium (KATP) channel to sense glucose, as occurs in beta-cells. However, while KATP channels are expressed in all GE neurons, only approximately half of VMH GE neurons express glucokinase, and approximately 30% express GLUT2 [78].

Multiple subtypes of GE neurons may exist that use alternate glucose sensing strategies. Thus, Claret et al. have shown that transgenic mice lacking the $\alpha 2$ subunit of AMPK, an important cellular fuel gauge, also lack GE neurons in ARC [79]. However, other authors [80] have shown that the acute pharmacological activation or inhibition of AMPK had no effect on glucose sensing in VMH GE neurons.

GI neurons have similar components to GE and, therefore, to beta-cells in glucose sensing, such as glucokinase [78, 81], as well as GLUT2 and GLUT4. However, the signal transduction pathway, whereby changes in intracellular ATP alter the activity of GI neurons, is completely different. In this case, the activation of $\alpha 2$ AMPK by glucose mediates the activation of VMH GI neurons, as described by Murphy et al. [82]. Hypothalamic $\alpha 2$ AMPK is a key kinase involved in the energy balance and is a target for a number of hormones and a transmitter that regulates the energy balance [83-88]. The pharmacological activation of hypothalamic AMPK increases food intake [89]. It is not therefore surprising that decreased glucose activates AMPK in GI neurons.

4. AMPK, together with mTOR and its downstream target S6K1, integrate nutrient and hormonal signals to maintain energy homeostasis

AMPK is a nutrient and energy sensor. AMPK senses cellular energy availability by detecting the AMP/ATP ratio. AMPK is activated in low energy states and promotes ATP-generating catabolic pathways and inhibits anabolic reactions [90-92].

AMPK is a heterotrimeric complex that contains a catalytic α -subunit ($\alpha 1$ or $\alpha 2$) and two regulatory subunits, β ($\beta 1$, $\beta 2$) and γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$). The α -subunit contains a kinase domain. The β -subunit contains the regions that permit interaction with other α and γ subunits and a carbohydrate-binding domain that facilitates binding to glycogen. The γ subunit contains four tandem repeats, which are four binding sites for adenosine derivatives denominated as CBS motifs (cystathionine β -synthase) [92, 93].

Different isoforms and the alternative splicing of some mRNAs encoding these subunits give rise to a wide range of heterotrimeric combinations. The expression of the catalytic subunits ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) is also different. The $\alpha 2$ subunit expression has been found in pancreatic beta-cells, neurons, skeletal muscle and the heart. The liver has 50% of each AMPK α isoform ($\alpha 1$ and $\alpha 2$), while adipose tissue expresses higher levels of the AMPK $\alpha 1$ isoform [93].

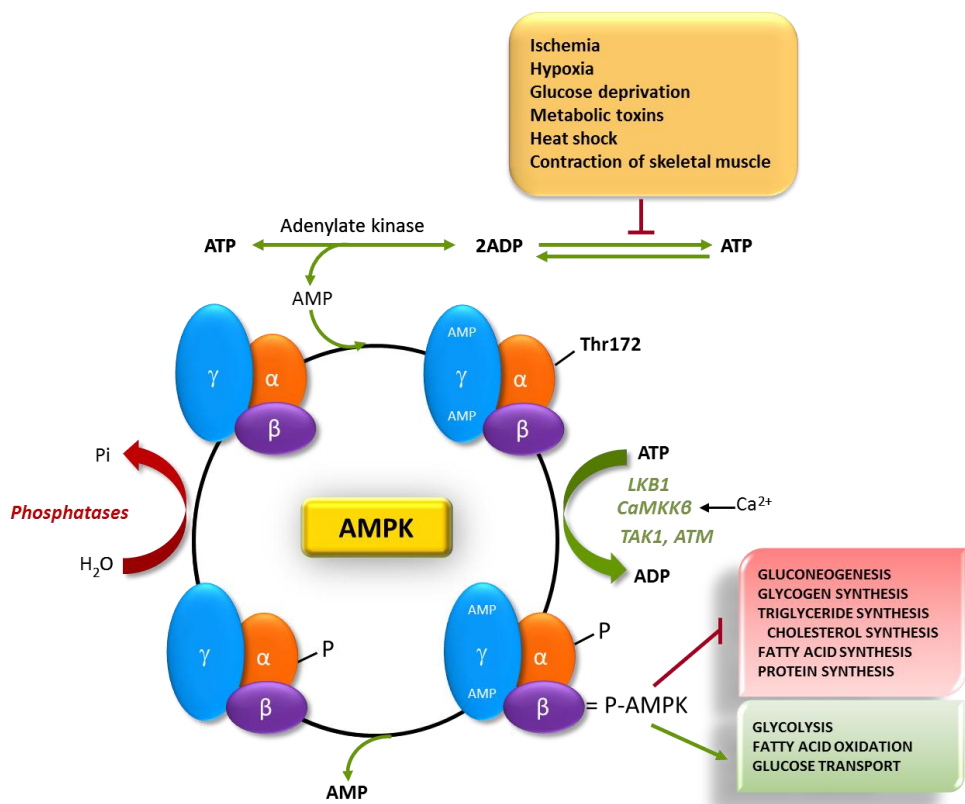


Figure 3. Schematic representation of AMPK's subunits and its activation process. AMPK detects changes in the cellular energy state that occur in response to nutrient variations or metabolic stress caused by changes in the AMP/ATP ratio. The activation of AMPK triggers key enzymes of glucose metabolism and fatty acids. The long-term effect of AMPK activation is the transcriptional control of the main elements involved in these metabolic pathways.

AMPK serine/threonine kinase activity is stimulated by the phosphorylation of the α -subunit on the Thr residue (Thr172). This activation process is regulated by several upstream kinases. The two main kinases in mammals are liver kinase B1 (LKB1), identified as a tumour-suppressor, and the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (mainly CaMKK β) [92, 93]. AMPK activity is also allosterically regulated by AMP binding to the γ subunit (Figure 3). Recent studies have found that AMP or ADP binding to the γ regulatory subunit protect the activated phosphorylated form of AMPK [94, 95]. AMP, ADP and ATP bind the γ subunit with similar affinity [94]. AMPK can be activated by increases in AMP and ADP according to changes in the cellular levels of adenosine derivatives. LKB1 phosphorylates AMPK in almost all tissues, while CaMKK β plays an important role in neurons and T lymphocytes. Other studies have suggested that a member of the MAPKKK family, TAK1 (transforming growth factor β -activated kinase) could be an important AMPK upstream kinase in cardiac

cells [96], and ATM (ataxia telangiectasia mutated) may also regulate the phosphorylation of Thr172 [97]. The level of Thr172 phosphorylation depends also on the activity of protein phosphatases [98, 99]. The effect of an increase in AMP inhibits phosphatase activity, and considering that LKB1 is constitutively active [100], the response after a rise in AMP increases the phosphorylation of Thr172 and the activation of AMPK.

AMPK can detect changes in cellular energy state that occur in response to nutrient variations. Any cellular or metabolic stress that reduces ATP production (e.g., heat shock, hypoxia, ischemia, glucose deprivation) or accelerates ATP consumption (e.g., contraction of skeletal muscle) will increase the ADP/ATP ratio, which will be amplified by the action of adenylate kinase, resulting in increased AMP/ATP with the consequent activation of AMPK (Figure 3). Once activated, AMPK first directly affects the activity of key enzymes of glucose metabolism and fatty acids, and second, proceeds to the long-term regulation of the transcriptional control of the main elements involved in these metabolic pathways. The net result of the activation of AMPK will restore the energy balance, inhibiting the anabolic pathways responsible for the synthesis of macromolecules, such as proteins and glycogen, and also of the following lipids: fatty acids, triglycerides and cholesterol, while activating the catabolic pathways, such as the oxidation of fatty acids, glucose uptake and glycolysis [101] (Figure 3).

The mTOR is a serine/threonine kinase that responds to nutrients and hormonal signals [102-104]. mTOR forms two distinct complexes with different sensitivities to rapamycin: mTORC1 and mTORC2. Both complexes contain mTOR, GβL (G-protein β-protein subunit-like), mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein) and deptor (DEP domain containing mTOR interacting protein) [103, 105, 106]. This complex, along with raptor (rapamycin-sensitive adaptor protein of mTOR) and PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) forms mTORC1, which is rapamycin and nutrient sensitive. However, mTORC2 comprises mTOR, GβL/mLST8 and deptor together with rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin 1 (mammalian stress-activated MAPK-interacting protein 1) and protor 1/2 (protein observed with rictor 1/2), which is insensitive to acute rapamycin (Figure 4)

mTORC1 regulates metabolism and cell growth in response to several environmental signals. The presence of amino acids, growth factors and mitogens stimulates mTORC1, which promotes anabolic processes. The mTORC1 activity phosphorylates multiple substrates, with S6K1 and the initiation factor 4E binding proteins (4E-BPs) being the best characterized [106-108]. The activation of mTORC1 induces the dissociation of 4E-BP from the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E), facilitating mRNA translation [109], and the activation of S6K1 promotes protein synthesis. Moreover, the mTORC2 function is less well known. It is known that mTORC2 phosphorylates Akt and appears to regulate mainly cell proliferation and cell survival [110] (Figure 4)

The effect growth factors have on mTORC1 is mediated through phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate kinase (PI3K) activation, the subsequent activation of phosphoinositide-dependent kinase (PDK1) and Akt. Once activated, Akt phosphorylates tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), suppressing the inhibitory effect of the TSC1-TSC2 complex in mTORC1.

TSC2 functions as a GTPase-activating protein of Ras homolog enriched in brain (Rheb), which is an mTORC1 activator. Mitogens activating the Ras/MAPK cascade also activate mTORC1. ERK phosphorylates TSC2, inhibiting the TSC1/TSC2 complex and inducing mTORC1 activity [111]. Raptor is additionally phosphorylated by ERK [112] (Figure 4)

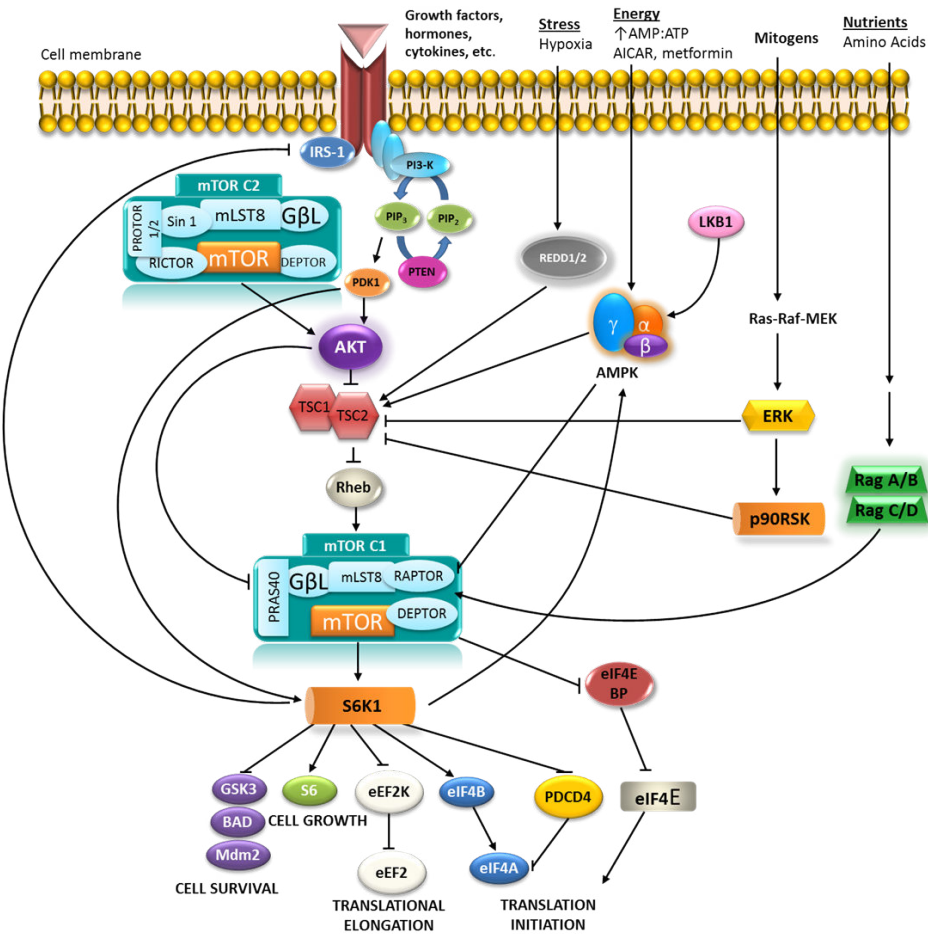


Figure 4. Network of proteins involved in the AMPK/mTOR/S6K1 signalling pathway

mTORC1 is also stimulated by amino acids, especially leucine. This activation pathway is independent of PI3K. The amino-acid regulation of mTOR needs rag GTPases and Rheb. The detailed mechanism of activation is unknown. It has been suggested that rag GTPases may control the localization of mTOR to specific vesicular membranes containing Rheb-GTP [113].

mTORC1 activity is inhibited in conditions of energy depletion coordinated with AMPK activity. An increase in AMP/ATP ratio activates AMPK, which phosphorylates the TSC2, and this modification induces the concomitant inhibition of mTORC1 mediated by the TSC1-TSC2 complex [114]. Furthermore, AMPK phosphorylates raptor in mTORC1, which down-regulates this complex [115].

In addition, energy depletion inhibits mTORC1 by a mechanism that is independent of AMPK activation. This effect is mediated by eliminating the GTP loading of Rheb [116].

4.1. Expression and regulation of these sensors in the VMH and LH

Studies in recent years have established a direct relationship between metabolic sensor activity in the hypothalamus and the regulation of food intake, body weight and energy homeostasis.

AMPK is broadly expressed throughout the brain. The $\alpha 2$ catalytic subunit is present with a high distribution in neurons and activated astrocytes [117]. Hypothalamic AMPK has been assumed to play a role in the central regulation of food intake and energy balance, whereby fasting increases and re-feeding decreases AMPK activity in various hypothalamic nuclei. Alterations of hypothalamic AMPK activity specifically affected $\alpha 2$ AMPK and did not change $\alpha 1$ AMPK [88].

The hypothalamic AMPK role has been studied *in vivo* by the expression of AMPK mutants: dominant negative AMPK (DN-AMPK) or constitutively active AMPK (CA-AMPK). The expression of CA-AMPK in the medial hypothalamus by adenoviruses increased food intake and body weight, whereas the expression of DN-AMPK inhibited them [88]. These alterations change the hypothalamic neuropeptide expression: the expression of CA-AMPK enhances the effect of fasting, increasing the expression of NPY and AgRP in the ARC and the melanin-concentrating hormone in the lateral hypothalamus, whereas the hypothalamic expression of DN-AMPK decreases the expression of orexigenic neuropeptides NPY and AgRP in ARC [88, 118].

mTORC1 is another metabolic sensor that plays an important role in the regulation of feeding behaviour and body weight in the hypothalamus [119, 120]. mTOR and its downstream target S6K1 are widely distributed in the rat brain. The activated forms of mTOR and S6K1 are localized mainly in the paraventricular and arcuate nuclei [119], being co-localized in a high percentage of orexigenic neurons that express AgRP/NPY and also in around half the anorexigenic neurons that express POMC/CART in the arcuate nuclei [119].

mTORC1 activation in the rat hypothalamus decreases food intake and body weight. Similar results were found by introducing constitutively active S6K1 mediated by adenovirus into the mediobasal hypothalamus of the rat brain. By contrast, the injection of dominant-negative S6K1 leads to an increase in food intake and body weight [121].

4.1.1. Nutrient regulation

Food intake leads to periods of fasting and feeding that are associated with substantial changes in the level of available nutrients (e.g., glucose and amino acids) and accompanied

by hormonal changes. Several studies describe the effect of glucose on both metabolic sensors, AMPK and mTOR, in hypothalamic areas. During fasting, the decrease in glucose concentration activates AMPK. This period is also characterized by low levels of glucose and amino acids, and the mTOR complex is kept inactive. The increase in glucose levels after food intake decreases the activity of AMPK and, conversely, the activity of the mTOR/S6K1 pathway is stimulated by higher levels of glucose and amino acids.

Thus, Kim et al. reported that decreasing intracellular glucose through the supply of 2-deoxyglucose increases hypothalamic AMPK activity and food intake. By contrast, hyperglycaemia decreases hypothalamic AMPK activity [122]. It was also observed that AMPK activity is inhibited in arcuate, ventromedial, dorsomedial, paraventricular nuclei and the LH by high glucose and re-feeding. [88]. Increases in α 2-AMPK activities in arcuate-ventromedial and paraventricular nuclei are also detected during insulin-induced hypoglycaemic in rats [123]. However, fasted rats recorded a decrease in the number of hypothalamic cells expressing mTOR and S6K1 activated forms specifically in the arcuate nucleus, with these changes responding to the availability of nutrients [119]. Similar findings were subsequently confirmed, also showing that the constitutive activation of S6K in the mediobasal hypothalamic area protects against the harmful effects of a high-fat diet [121].

It has also been established that AMPK and mTOR are involved in the anorexigenic effect induced by high protein diets. Thus, a high protein diet and the intracerebroventricular administration of leucine decreased AMPK phosphorylation in the rat hypothalamus [120]. The activation of hypothalamic mTORC1 is additionally produced by a high protein diet and the intracerebroventricular administration of amino acids or leucine [119, 124].

4.1.2. Gut hormone regulation and signals from energy stores

The effects of glucose, amino acids and other nutrients are reinforced by the effects of intestinal peptides, as stated above. They are able to regulate food intake, energetic homeostasis and body weight. The gastrointestinal tract responds to gut contents by secreting hormones, which can serve to inform the CNS of nutrient status. Thus, circulating ghrelin, the only intestinal peptide with orexigenic properties, is high in the period before a meal, and the level declines an hour after eating [125]. Ghrelin stimulates food intake in lean and obese humans [126]. In contrast, anorexigenic intestinal peptides as peptide YY (PYY), pancreatic polypeptide (PP), GLP-1, oxyntomodulin and cholecystokinin are low during the fasting period, and their level increases after a meal, and some of them are released proportionally to the amount of calories ingested (Reviewed in [127]).

Other signals that inform the state of energy stores, such as leptin and insulin levels, are important modulators of feeding behaviour. Insulin regulates the storage of nutrients and also informs the brain about the energy balance [128]. Leptin is produced by adipose tissue and informs the brain about the energy storage status [128].

We now know that the function of at least some of these peptides may be mediated by the modulation of hypothalamic metabolic sensors. Thus, it has been reported that hypothalamic AMPK activity is also regulated by several orexigenic and anorexigenic signals. Ghrelin,

the intestinal peptide with orexigenic properties, activates AMPK and stimulates food intake [87, 89]. By contrast, anorexigenic peptides such as leptin decrease AMPK activity in the ARC and PVN [88, 89, 129]. However, leptin treatment increased mTOR and S6K1 hypothalamic activity [130].

It has recently been suggested that ghrelin activates AMPK in presynaptic neurons, inducing an increase in activity in NPY/AgRP neurons promoting sustained food intake, and this signal stops after leptin is released by adipose tissue, signalling to stimulate POMC neurons inhibiting feeding and also to inhibit the AMPK in the presynaptic neurons, inactivating the release of NPY/AgRP [131].

Inoki et al. previously reported that the activation of AMPK induces the inhibition of mTOR activity [114]. It has recently been posited that S6K phosphorylates $\alpha 2$ AMPK. This process is necessary for the leptin effects on hypothalamic AMPK activity [132].

These findings indicate that hypothalamic AMPK and mTOR respond to changes in glucose and other nutrients in opposite ways, and their effects on the regulation of food intake may overlap.

5. Modulation of AMPK and S6K by GLP-1/exendin-4 in these hypothalamic areas

As indicated before, GLP-1 is able to induce several effects contributing to the control of feeding behaviour. It inhibited gastric acid secretion and emptying, stimulated postprandial insulin secretion and inhibited glucagon release. GLP-1 treatment to type 2 diabetic subjects normalized the fasting levels of blood glucose and decreased postprandial glucose levels. We have also reported that GLP-1 reduces glucose metabolism in the human hypothalamus and brain stem [133].

In general, the brain activity of AMPK is activated by fasting and is inhibited by re-feeding [88, 122, 123], but the effect of glucose on AMPK also regulates *Ampk* expression in VMH [134]. Thus, fasting increased *Ampk* mRNA expression in the hypothalamus of rats, and the ICV administration of GLP-1 reduced that effect [135].

The glucose effect on AMPK might be region-specific in hypothalamic areas that have opposite effects over the control of feeding behaviour. We have also reported, using rat hypothalamic slices, that high glucose levels decrease the expression of *Ampk- $\alpha 2$* mRNA, specifically in the LH, but not in the VMH [83]. The decrease in *AMPK $\alpha 2$* expression in response to high glucose levels was reversed by the presence of GLP-1 [83]. Sanz et al. have also reported a different response to glucose in the VMH and LH [136, 137]. The distinctive response in the LH compared to the VMH may be explained by the different role these two areas have in the control of food intake.

Results obtained from in vivo studies conducted on lean and obese Zucker rats showed that the effects fasting and re-feeding have on the activity of AMPK and S6K in the areas involved in the control of feeding are modulated by exendin-4 treatment [83].

It has been previously reported that the anorexigenic effects produced by the intraperitoneal administration of exendin-4 led to a reduction in food intake and increased the period between meals [138]. Additionally, the peripheral administration of exendin-4 and liraglutide regulates food intake by activating the GLP-1 receptors expressed on both vagal afferents and CNS [139]. Recent studies conducted within our group [83] have focused on clarifying the coordinated effects of fasting, re-feeding and exendin-4 administration on the activity of AMPK and S6K in the VMH and LH. The results of these studies show that fasting increases hypothalamic AMPK activity in both areas in lean Zucker rats. However, the subcutaneous administration of exendin-4 over the last hour reversed this effect, whereas exendin-4 activated AMPK in animals re-fed for two hours when AMPK activity was markedly inhibited. The activation degree of AMPK after four hours of re-feeding differed in both areas. Thus, the activation level of AMPK in the VMH was similar to fasted rats. However, AMPK activity in the LH was still low, and exendin-4 treatment decreased AMPK activity in the VMH, whereas no significant effect was detected in the LH (Figure 5).

Anorexic peptides also regulate the mTOR/S6K1 pathway in hypothalamic areas. Insulin and leptin increases the activated forms of S6K [119]. The administration of exendin-4 also regulates S6K activity and the effect is dependent on the activation status of S6K, as occurred with AMPK. We thus found that S6K activation peaked in animals re-fed for four hours. However, the administration of exendin-4 strongly stimulated S6K activity in animals re-fed for two hours. In contrast, exendin-4 decreased S6K activity in the VMH of lean rats re-fed for four hours [83] (Figure 5).

The use of rat organotypic hypothalamic slices confirmed that AMPK activity at low glucose concentrations was stimulated, and S6K activity was maintained with minimal activation [83]. GLP-1 treatment reversed the effect of glucose on AMPK and did not modify S6K activity in the VMH and LH. High levels of glucose stimulated S6K activity in both nuclei, and the presence of GLP-1 reversed such activation. Similar results were found using hypothalamic GT1-7 and neuroblastoma N2A cell lines [83]. The metabolic sensors in these cells respond to glucose as described above, and GLP-1 treatment reversed the glucose effects [83].

The effect of GLP-1 on AMPK activity was also reported in other brain areas. Thus, GLP-1R activation in hindbrain suppressed food intake, and that effect is accompanied by the suppression of AMPK activity [140].

The complexities of the regulation of hypothalamic AMPK activity have previously been described for some hormones. Thus, the cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) has been reported to have an anorexic effect after intracerebroventricular administration [141], while CART injected directly into the paraventricular or arcuate nucleus of fasted rats increases food intake [142]. Likewise, differences in the effect of regulatory peptides on AMPK as a function of nutritional status have been previously described. Ghrelin or cannabinoids have ad libitum effects [143], whereas leptin [88] and adiponectin [144] only have an effect after variable periods of fasting or re-feeding.

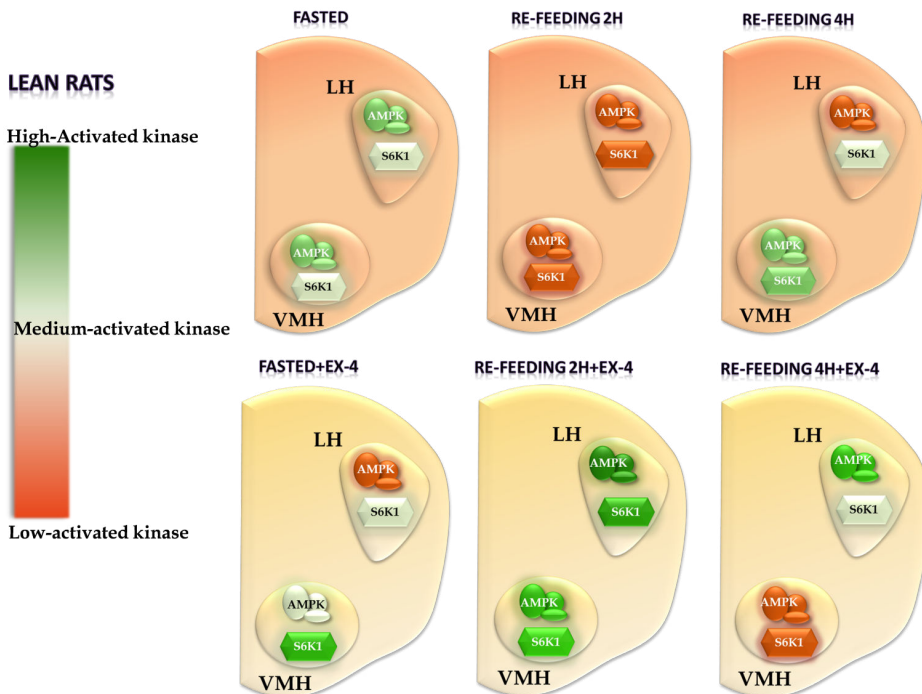


Figure 5. Effects of exendin-4 administration in fasted or re-fed lean rats on the activity of AMPK and S6K. Lean Zucker rats were fasted or re-fed for two or four hours. In some cases, the GLP-1 analogue exendin-4 (100 nM) was administered. The activation states of AMPK and S6K were determined by quantifying phospho-specific forms in VMH and LH areas.

6. GLP-1/exendin-4 as a compensator of the disturbances in AMPK and S6K activities occurring in obesity

In obesity, the elevated levels of nutrients and hormonal modifications alter the activity of hypothalamic metabolic sensors. Thus, diet-induced obesity reduced hypothalamic AMPK activity [145]. The GLP-1 receptor agonist exendin-4 is one of the agents used in the treatment of type 2 diabetes [146] and is a long-acting receptor agonist of GLP-1 that also produces weight loss [147-149].

The obese Zucker (*fa/fa*) rat provides a well-established animal model of insulin resistance and genetic obesity and, in comparison with lean Zucker rats, manifests hyperinsulinemia and hyperlipidemia. We have previously noted that the peripheral long-term subcutaneous administration of exendin-4 decreased food intake and induced weight loss in both obese and lean control Zucker rats [15].

Zucker rats have been used to analyze the exendin-4 effect on the activity of AMPK and S6K in the VMH and LH areas [83]. The results obtained showed that AMPK activity was lower in the obese than in the lean Zucker rats in both areas. Interestingly, the effect of exendin-4 administration on fasted obese Zucker rats was different compared to the lean rats. The absence of exendin-4 effect in obese rats maintains AMPK activity at a level of activation similar to the lean animals after the administration of exendin-4 [83] (Figure 5).

These results suggest that GLP-1/exendin-4 might compensate for the alterations in AMPK, activity produced either by oscillations in glucose levels or by pathologies such as obesity or episodes of hyperinsulinemia (Figure 5, 6).

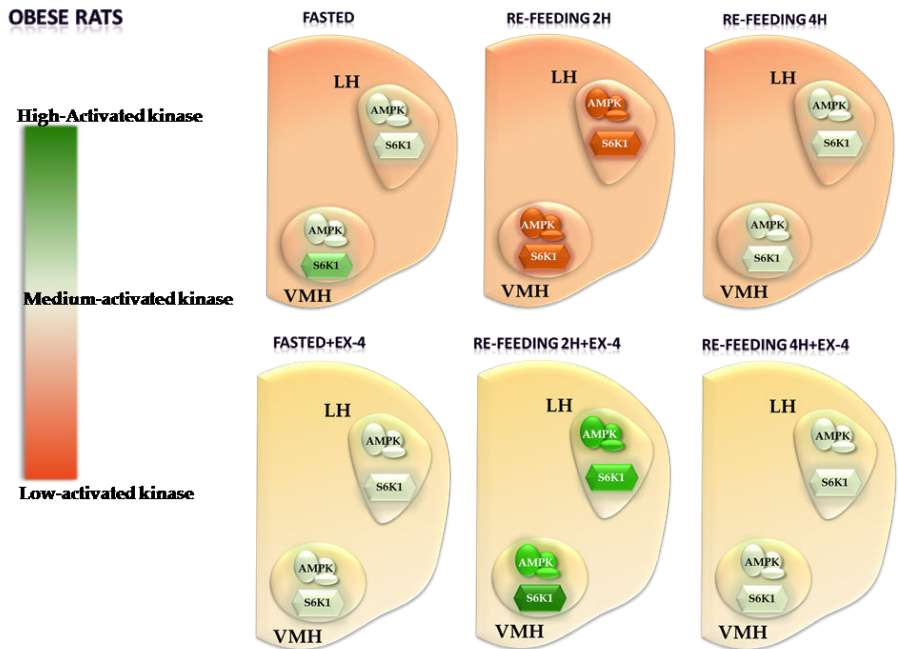


Figure 6. Effects of exendin-4 administration in fasted or re-fed obese rats on the activity of AMPK and S6K. Lean Zucker rats were fasted or re-fed for two or four hours. In some cases, the GLP-1 analogue exendin-4 (100 nM) was administered. The activation states of AMPK and S6K were determined by quantifying phospho-specific forms in the VMH and LH areas.

Another difference in the level of activation of AMPK between obese and lean Zucker rats was observed after re-feeding for four hours. The AMPK activity in the LH was higher in obese compared to lean animals (Figure 5, 6).

After two hours of re-feeding, exendin-4 treatment increased S6K activity in the VMH and LH in obese rats. Nevertheless, the effect of exendin-4 on S6K activity in the VMH differed between obese and lean rats. Exendin-4 administration did not modify S6K activity in the

LH of lean and obese rats after four hours of re-feeding, whereas exendin-4 reduced S6K activity in the VMH of lean Zucker rats but not in their obese counterparts [83].

The prolonged activation of hypothalamic S6K inhibits insulin signalling and contributes to hepatic insulin resistance [150], suggesting that hypothalamic S6K activation would be involved in the pathogenesis of diet-induced hepatic insulin resistance. Our data indicate that S6K activity in the presence of exendin-4 could be decreased when this protein is maximally activated. This suggests that exendin-4 treatment in diabetic subjects could also improve hepatic insulin resistance.

7. Conclusions

We have reported here some of the many actions of GLP-1, such as, its role as an incretin hormone and controlling food intake. Accordingly, we have reviewed the importance of hypothalamic areas in the control of food intake, such as, for example, the ventromedial and lateral hypothalamus. In parallel, the function of AMPK and the mTOR/S6K pathway has been studied in those areas. Likewise, we have explored the coordinated response of hypothalamic AMPK and S6K to alterations in nutritional status and energy storage. Our results have revealed both the activation of AMPK and S6K in the VMH and LH in response to changes in glucose concentration or nutritional state, and that GLP-1/exendin-4 acts by counteracting the activation/inactivation of these kinases and contributing to the balance of proper AMPK and S6K activation. It therefore seems that GLP-1/exendin-4 might be acting in the VMH and LH, interacting with the AMPK/S6K signalling pathways, and modulating the activation status of AMPK and S6K in response to nutrient fluctuations. Likewise, GLP-1/exendin-4 would contribute to the normalization of the altered levels of these kinases in pathophysiological states such as obesity, for example.

Author details

Veronica Hurtado^{1,2,3}, Isabel Roncero^{1,2,3}, Enrique Blazquez^{1,2,3}, Elvira Alvarez^{1,2,3} and Carmen Sanz^{1,2,3,4}

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology. Faculty of Medicine. University Complutense of Madrid, Spain

2 Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Spain

3 The Center for Biomedical Research in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Spain

4 Department of Cellular Biology. Faculty of Medicine. University Complutense of Madrid, Spain

References

- [1] Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* 1986 Sep 5;261(25):11880-9.
- [2] Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS, Kirkegaard P. Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man. *Diabetologia* 1987 Nov;30(11):874-81.
- [3] Goke R, Trautmann ME, Haus E, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, et al. Signal transmission after GLP-1(7-36)amide binding in RINm5F cells. *Am J Physiol* 1989 Sep; 257(3 Pt 1):G397-401.
- [4] Uttenthal LO, Blazquez E. Characterization of high-affinity receptors for truncated glucagon-like peptide-1 in rat gastric glands. *FEBS Lett* 1990 Mar 12;262(1):139-41.
- [5] Valverde I, Merida E, Delgado E, Trapote MA, Villanueva-Penacarrillo ML. Presence and characterization of glucagon-like peptide-1(7-36) amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue. *Endocrinology* 1993 Jan;132(1):75-9.
- [6] Richter G, Goke R, Goke B, Schmidt H, Arnold R. Characterization of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptors of rat lung membranes by covalent cross-linking. *FEBS Lett* 1991 Mar 25;280(2):247-50.
- [7] Shimizu I, Hirota M, Ohboshi C, Shima K. Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in rat brain. *Endocrinology* 1987 Sep;121(3): 1076-82.
- [8] Kanse SM, Kreyman B., Ghatei, M.A., Shima, K. Identification and localization of glucagon-like peptide-1(7-36) amide binding sites in the rat brain and lung. *FEBS Lett* 1987;241:209-12.
- [9] Uttenthal LO, Toledano A, Blazquez E. Autoradiographic localization of receptors for glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in rat brain. *Neuropeptides* 1992 Mar;21(3): 143-6.
- [10] Calvo JC, Yusta B, Mora F, Blazquez E. Structural characterization by affinity cross-linking of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptor in rat brain. *J Neurochem* 1995 Jan;64(1):299-306.
- [11] Calvo JC, Gisolfi CV, Blazquez E, Mora F. Glucagon-like peptide-1(7-36)amide induces the release of aspartic acid and glutamine by the ventromedial hypothalamus of the conscious rat. *Brain Res Bull* 1995;38(5):435-9.
- [12] Mora F, Exposito I, Sanz B, Blazquez E. Selective release of glutamine and glutamic acid produced by perfusion of GLP-1 (7-36) amide in the basal ganglia of the conscious rat. *Brain Res Bull* 1992 Sep-Oct;29(3-4):359-61.

- [13] Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*1996 Jan 4;379(6560):69-72.
- [14] Navarro M, Rodriguez de Fonseca F, Alvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gomez R, et al. Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem*1996 Nov;67(5):1982-91.
- [15] Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Maestre O, et al. Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism*2000 Jun;49(6):709-17.
- [16] Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Vazquez P, Blazquez E. Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. *J Neurochem*2002 Jan;80(1):45-53.
- [17] Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Thorens B, Blazquez E. Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem*1996 Mar;66(3):920-7.
- [18] Roncero I, Alvarez E, Chowen JA, Sanz C, Rabano A, Vazquez P, et al. Expression of glucose transporter isoform GLUT-2 and glucokinase genes in human brain. *J Neurochem*2004 Mar;88(5):1203-10.
- [19] Roncero I, Alvarez E, Vazquez P, Blazquez E. Functional glucokinase isoforms are expressed in rat brain. *J Neurochem*2000 May;74(5):1848-57.
- [20] Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefer J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*2008 May 6;117(18):2340-50.
- [21] Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, Ray B, Bailey JA, Holloway HW, et al. GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*2010;19(4):1205-19.
- [22] Barragan JM, Rodriguez RE, Blazquez E. Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in rats. *Am J Physiol*1994 Mar;266(3 Pt 1):E459-66.
- [23] Barragan JM, Rodriguez RE, Eng J, Blazquez E. Interactions of exendin-(9-39) with the effects of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide and of exendin-4 on arterial blood pressure and heart rate in rats. *Regul Pept*1996 Nov 14;67(1):63-8.
- [24] Bulotta A, Hui H, Anastasi E, Bertolotto C, Boros LG, Di Mario U, et al. Cultured pancreatic ductal cells undergo cell cycle re-distribution and beta-cell-like differentiation in response to glucagon-like peptide-1. *J Mol Endocrinol*2002 Dec;29(3):347-60.

- [25] De Leon DD, Deng S, Madani R, Ahima RS, Drucker DJ, Stoffers DA. Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy. *Diabetes* 2003 Feb;52(2):365-71.
- [26] Chia CW, Egan JM. Incretin-based therapies in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 Oct;93(10):3703-16.
- [27] Moore B. On the treatment of Diabetus mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem J* 1906;1(1):28-38.
- [28] Zunz E, La Barre J.. Contributions a l'etude des variations physiologiques de la secretion interne du pancreas. relations entre les secretions externe et interne du pancreas. relations entre les secretions externe et interne du pancreas.. *Arch Int Physiol Biochim* 1929;31:20-44.
- [29] Elrick H, Stimmiller L, Hlad CJ, Jr., Arai Y. Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. *J Clin Endocrinol Metab* 1964 Oct;24:1076-82.
- [30] Unger RH, Eisentraut AM. Entero-insular axis. *Arch Intern Med* 1969 Mar;123(3):261-6.
- [31] Creutzfeldt W. The incretin concept today. *Diabetologia* 1979 Feb;16(2):75-85.
- [32] Mudaliar S, Henry RR. The incretin hormones: from scientific discovery to practical therapeutics. *Diabetologia* 2012 Jul;55(7):1865-8.
- [33] Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986 Jan;29(1):46-52.
- [34] Kreymann B, Williams G, Ghatgei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 1987 Dec 5;2(8571):1300-4.
- [35] Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993 Jan;91(1):301-7.
- [36] Nauck MA, Kleine N, Orskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1993 Aug;36(8):741-4.
- [37] Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 2006 Nov 11;368(9548):1696-705.
- [38] Vara E, Arias-Diaz J, Garcia C, Balibrea JL, Blazquez E. Glucagon-like peptide-1(7-36) amide stimulates surfactant secretion in human type II pneumocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Mar;163(4):840-6.

- [39] Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*2002 Aug 8;418(6898):650-4.
- [40] Tang-Christensen M, Larsen PJ, Thulesen J, Romer J, Vrang N. The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med*2000 Jul;6(7):802-7.
- [41] Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*2000 Apr 6;404(6778):661-71.
- [42] Gutzwiller JP, Goke B, Drewe J, Hildebrand P, Ketterer S, Handschin D, et al. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut*1999 Jan;44(1):81-6.
- [43] Orskov C, Poulsen SS, Moller M, Holst JJ. Glucagon-like peptide I receptors in the subfornical organ and the area postrema are accessible to circulating glucagon-like peptide I. *Diabetes*1996 Jun;45(6):832-5.
- [44] Lind RW, Thunhorst RL, Johnson AK. The subfornical organ and the integration of multiple factors in thirst. *Physiol Behav*1984 Jan;32(1):69-74.
- [45] Zueco JA, Esquifino AI, Chowen JA, Alvarez E, Castrillon PO, Blazquez E. Coexpression of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor, vasopressin, and oxytocin mRNAs in neurons of the rat hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: effect of GLP-1(7-36)amide on vasopressin and oxytocin release. *J Neurochem*1999 Jan;72(1):10-6.
- [46] Holst JJ, Orskov, C. Glucagon and other proglucagon-derived peptides.. In: Walsh JH DG, editor. New York. : Raven; 1994.
- [47] Schjoldager BT, Mortensen PE, Christiansen J, Orskov C, Holst JJ. GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. *Dig Dis Sci*1989 May;34(5):703-8.
- [48] Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B, Efendic S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*1992 May 14;326(20):1316-22.
- [49] Berridge KC. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav*2009 Jul 14;97(5):537-50.
- [50] Chaudhri OB, Salem V, Murphy KG, Bloom SR. Gastrointestinal satiety signals. *Annu Rev Physiol*2008;70:239-55.
- [51] Hetherington A, Ranson S. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec*1940;78:149-72.

- [52] Anand BK, Chhina GS, Sharma KN, Dua S, Singh B. Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *Am J Physiol* 1964 Nov; 207:1146-54.
- [53] Stellar E. The physiology of motivation. *Psychol Rev* 1954 Jan; 61(1):5-22.
- [54] Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 1999 Feb; 20(1):68-100.
- [55] Elmquist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiol Behav* 2001 Nov-Dec; 74(4-5):703-8.
- [56] Adage T, Scheurink AJ, de Boer SF, de Vries K, Konsman JP, Kuipers F, et al. Hypothalamic, metabolic, and behavioral responses to pharmacological inhibition of CNS melanocortin signaling in rats. *J Neurosci* 2001 May 15; 21(10):3639-45.
- [57] de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jan 6; 95(1):322-7.
- [58] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998 Feb 20; 92(4):573-85.
- [59] Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 1996 Mar 21; 380(6571):243-7.
- [60] Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Bakhos N, Routh VH. Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 2001 Dec; 50(12):2673-81.
- [61] Shiraishi T. Noradrenergic neurons modulate lateral hypothalamic chemical and electrical stimulation-induced feeding by sated rats. *Brain Res Bull* 1991 Sep-Oct; 27(3-4):347-51.
- [62] Mizuno Y, Oomura Y. Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. *Brain Res* 1984 Jul 30; 307(1-2):109-16.
- [63] Nakano Y, Oomura Y, Lenard L, Nishino H, Aou S, Yamamoto T, et al. Feeding-related activity of glucose- and morphine-sensitive neurons in the monkey amygdala. *Brain Res* 1986 Dec 3; 399(1):167-72.
- [64] Raybould HE. Sensing of glucose in the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* 2007 Apr 30; 133(1):86-90.
- [65] Koyama Y, Coker RH, Stone EE, Lacy DB, Jabbour K, Williams PE, et al. Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. *Diabetes* 2000 Sep; 49(9):1434-42.

- [66] Matveyenko AV, Donovan CM. Metabolic sensors mediate hypoglycemic detection at the portal vein. *Diabetes*2006 May;55(5):1276-82.
- [67] Silver IA, Erecinska M. Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci*1994 Aug;14(8):5068-76.
- [68] Borg WP, Sherwin RS, During MJ, Borg MA, Shulman GI. Local ventromedial hypothalamus glucopenia triggers counterregulatory hormone release. *Diabetes*1995 Feb;44(2):180-4.
- [69] Dunn-Meynell AA, Sanders NM, Compton D, Becker TC, Eiki J, Zhang BB, et al. Relationship among brain and blood glucose levels and spontaneous and glucoprivic feeding. *J Neurosci*2009 May 27;29(21):7015-22.
- [70] Ashford ML, Boden PR, Treherne JM. Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflugers Arch*1990 Jan;415(4):479-83.
- [71] Fioramonti X, Lorsignol A, Taupignon A, Penicaud L. A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes*2004 Nov;53(11):2767-75.
- [72] Silver IA, Erecinska M. Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *J Neurophysiol*1998 Apr;79(4):1733-45.
- [73] Wang R, Liu X, Hentges ST, Dunn-Meynell AA, Levin BE, Wang W, et al. The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes*2004 Aug;53(8):1959-65.
- [74] Song Z, Routh VH. Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes*2005 Jan;54(1):15-22.
- [75] Song Z, Routh VH. Recurrent hypoglycemia reduces the glucose sensitivity of glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*2006 Nov;291(5):R1283-7.
- [76] Murphy BA, Fioramonti X, Jochnowitz N, Fakira K, Gagen K, Contie S, et al. Fasting enhances the response of arcuate neuropeptide Y-glucose-inhibited neurons to decreased extracellular glucose. *Am J Physiol Cell Physiol*2009 Apr;296(4):C746-56.
- [77] VanGilder RL, Kelly KA, Chua MD, Ptachcinski RL, Huber JD. Administration of sesamol improved blood-brain barrier function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Brain Res*2009 Jul;197(1):23-34.
- [78] Kang L, Routh VH, Kuzhikandathil EV, Gaspers LD, Levin BE. Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes*2004 Mar;53(3):549-59.

- [79] Claret M, Smith MA, Batterham RL, Selman C, Choudhury AI, Fryer LG, et al. AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 2007 Aug;117(8):2325-36.
- [80] Cotero VE, Routh VH. Insulin blunts the response of glucose-excited neurons in the ventrolateral-ventromedial hypothalamic nucleus to decreased glucose. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009 May;296(5):E1101-9.
- [81] Dunn-Meynell AA, Routh VH, Kang L, Gaspers L, Levin BE. Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* 2002 Jul;51(7):2056-65.
- [82] Murphy BA, Fakira KA, Song Z, Beuve A, Routh VH. AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009 Sep;297(3):C750-8.
- [83] Hurtado-Carneiro V, Sanz C, Roncero I, Vazquez P, Blazquez E, Alvarez E. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) can reverse AMP-activated protein kinase (AMPK) and S6 kinase (P70S6K) activities induced by fluctuations in glucose levels in hypothalamic areas involved in feeding behaviour. *Mol Neurobiol* 2012 Apr;45(2):348-61.
- [84] Hegyi K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 2004;28(3):159-69.
- [85] Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005 Jan;1(1):15-25.
- [86] Kohno D, Sone H, Minokoshi Y, Yada T. Ghrelin raises $(Ca^{2+})_i$ via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Feb 8;366(2):388-92.
- [87] Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, et al. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2005 Jul 1;280(26):25196-201.
- [88] Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004 Apr 1;428(6982):569-74.
- [89] Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004 Mar 26;279(13):12005-8.
- [90] Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J* 2003 Oct 1;375(Pt 1):1-16.
- [91] Hardie DG, Carling D, Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 1998;67:821-55.

- [92] Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*2012 Apr;13(4):251-62.
- [93] Viollet B, Athea Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, et al. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci*2009;14:19-44.
- [94] Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*2011 Apr 14;472(7342):230-3.
- [95] Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, Scott JW, Ling N, Tam S, et al. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*2011 Jun 17;332(6036):1433-5.
- [96] Xie M, Zhang D, Dyck JR, Li Y, Zhang H, Morishima M, et al. A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*2006 Nov 14;103(46):17378-83.
- [97] Zhou K, Bellenguez C, Spencer CC, Bennett AJ, Coleman RL, Tavendale R, et al. Common variants near ATM are associated with glycemic response to metformin in type 2 diabetes. *Nat Genet*2011 Feb;43(2):117-20.
- [98] Garcia-Haro L, Garcia-Gimeno MA, Neumann D, Beullens M, Bollen M, Sanz P. The PP1-R6 protein phosphatase holoenzyme is involved in the glucose-induced dephosphorylation and inactivation of AMP-activated protein kinase, a key regulator of insulin secretion, in MIN6 beta cells. *Faseb J*2010 Dec;24(12):5080-91.
- [99] Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab*2006 Dec;4(6):465-74.
- [100] Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*2007 Apr 1;403(1):139-48.
- [101] Lim CT, Kola B, Korbonits M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol*2010 Feb;44(2):87-97.
- [102] Foster KG, Acosta-Jaquez HA, Romeo Y, Ekim B, Soliman GA, Carriere A, et al. Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *J Biol Chem*2010 Jan 1;285(1):80-94.
- [103] Alessi DR, Pearce LR, Garcia-Martinez JM. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal*2009;2(67):pe27.
- [104] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*2011 Jan;12(1):21-35.
- [105] Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell*2010 Oct 22;40(2):310-22.

- [106] Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J*2012 Jan 1;441(1):1-21.
- [107] Meyuhas O, Dreazen A. Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci*2009;90:109-53.
- [108] Fenton TR, Gout IT. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol* Jan;43(1):47-59.
- [109] Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*2009 May;10(5):307-18.
- [110] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*2005 Feb 18;307(5712):1098-101.
- [111] Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*2005 Apr 22;121(2):179-93.
- [112] Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, Moreau J, Bonneil E, Thibault P, et al. ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*2011 Jan 7;286(1):567-77.
- [113] Flinn RJ, Yan Y, Goswami S, Parker PJ, Backer JM. The late endosome is essential for mTORC1 signaling. *Mol Biol Cell*2010 Mar 1;21(5):833-41.
- [114] Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*2003 Nov 26;115(5):577-90.
- [115] Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*2008 Apr 25;30(2):214-26.
- [116] Zheng M, Wang YH, Wu XN, Wu SQ, Lu BJ, Dong MQ, et al. Inactivation of Rheb by PRAK-mediated phosphorylation is essential for energy-depletion-induced suppression of mTORC1. *Nat Cell Biol*2011 Mar;13(3):263-72.
- [117] Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem*1999 Apr;72(4):1707-16.
- [118] Minokoshi Y, Shiuchi T, Lee S, Suzuki A, Okamoto S. Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutrition*2008 Sep;24(9):786-90.
- [119] Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*2006 May 12;312(5775):927-30.
- [120] Ropelle ER, Pauli JR, Fernandes MF, Rocco SA, Marin RM, Morari J, et al. A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of

rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes* 2008 Mar; 57(3):594-605.

- [121] Blouet C, Ono H, Schwartz GJ. Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metab* 2008 Dec; 8(6):459-67.
- [122] Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, et al. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2004 Jul; 10(7):727-33.
- [123] Han SM, Namkoong C, Jang PG, Park IS, Hong SW, Katakami H, et al. Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia* 2005 Oct; 48(10):2170-8.
- [124] Lynch CJ, Gern B, Lloyd C, Hutson SM, Eicher R, Vary TC. Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006 Sep; 291(3):E621-30.
- [125] Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001 Aug; 50(8):1714-9.
- [126] Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Dec; 86(12):5992.
- [127] Hameed S, Dhillon WS, Bloom SR. Gut hormones and appetite control. *Oral Dis* 2009 Jan; 15(1):18-26.
- [128] Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59:267-85.
- [129] Mountjoy PD, Bailey SJ, Rutter GA. Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity. *Diabetologia* 2007 Jan; 50(1):168-77.
- [130] Cota D, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ. The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci* 2008 Jul 9; 28(28):7202-8.
- [131] Yang Y, Atasoy D, Su HH, Sternson SM. Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 2011 Sep 16; 146(6):992-1003.
- [132] Dagon Y, Hur E, Zheng B, Wellenstein K, Cantley LC, Kahn BB. p70S6 Kinase Phosphorylates AMPK on Serine 491 to Mediate Leptin's Effect on Food Intake. *Cell Metab* 2012 Jul 3; 16(1):104-12.
- [133] Alvarez E, Martinez MD, Roncero I, Chowen JA, Garcia-Cuartero B, Gispert JD, et al. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on

glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem* 2005 Feb;92(4):798-806.

- [134] McCrimmon RJ, Fan X, Cheng H, McNay E, Chan O, Shaw M, et al. Activation of AMP-activated protein kinase within the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses in rats with defective counterregulation. *Diabetes* 2006 Jun;55(6):1755-60.
- [135] Seo S, Ju S, Chung H, Lee D, Park S. Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *Endocr J* 2008 Oct;55(5):867-74.
- [136] Sanz C, Roncero I, Vazquez P, Navas MA, Blazquez E. Effects of glucose and insulin on glucokinase activity in rat hypothalamus. *J Endocrinol* 2007 May;193(2):259-67.
- [137] Sanz C, Vazquez P, Navas MA, Alvarez E, Blazquez E. Leptin but not neuropeptide Y up-regulated glucagon-like peptide 1 receptor expression in GT1-7 cells and rat hypothalamic slices. *Metabolism* 2008 Jan;57(1):40-8.
- [138] Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW. Evidence that intestinal glucagon-like peptide-1 plays a physiological role in satiety. *Endocrinology* 2009 Apr;150(4):1680-7.
- [139] Kanoski SE, Fortin SM, Arnold M, Grill HJ, Hayes MR. Peripheral and central GLP-1 receptor populations mediate the anorectic effects of peripherally administered GLP-1 receptor agonists, liraglutide and exendin-4. *Endocrinology* 2011 Aug;152(8):3103-12.
- [140] Hayes MR, Lechner TM, Zhao S, Lee GS, Chowansky A, Zimmer D, et al. Intracellular signals mediating the food intake-suppressive effects of hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation. *Cell Metab* 2011 Mar 2;13(3):320-30.
- [141] Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998 May 7;393(6680):72-6.
- [142] Abbott CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA, et al. Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* 2001 Aug;142(8):3457-63.
- [143] McCrimmon RJ, Shaw M, Fan X, Cheng H, Ding Y, Vella MC, et al. Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes* 2008 Feb;57(2):444-50.
- [144] Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007 Jul;6(1):55-68.

- [145] Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 2006 Jul 14;281(28):18933-41.
- [146] Niswender K. Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction - a complex interplay. *Diabetes Obes Metab* 2010 Apr;12(4):267-87.
- [147] Blonde L, Klein EJ, Han J, Zhang B, Mac SM, Poon TH, et al. Interim analysis of the effects of exenatide treatment on A1C, weight and cardiovascular risk factors over 82 weeks in 314 overweight patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2006 Jul; 8(4):436-47.
- [148] Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, Schmidt WE, Montanya E, Brett JH, et al. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet* 2009 Jul 4;374(9683): 39-47.
- [149] Montanya E, Sesti G. A review of efficacy and safety data regarding the use of liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 2009 Nov;31(11):2472-88.
- [150] Ono H, Pocai A, Wang Y, Sakoda H, Asano T, Backer JM, et al. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest* 2008 Aug;118(8):2959-68.

